

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Raíssa Almeida Silva

**INFECÇÃO POR *SALMONELLA* HEIDELBERG EM PINTOS DE CORTE
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO COMPOSTOS BIOATIVOS
COMERCIAIS**

Areia, PB

2018

Raíssa Almeida Silva

**Infecção por *Salmonella* Heidelberg em Pintos de Corte Alimentados com Dietas
Contendo Compostos Bioativos Comerciais**

Dissertação apresentada à Universidade federal da Paraíba - UFPB, Campus de Areia, como parte das exigências para a obtenção do título de **Mestre em Ciência Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Co-orientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Areia, PB
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação
Biblioteca Central da Universidade Federal da Paraíba

S586i

Silva, Raissa Almeida.

Infecção por *Salmonella Heidelberg* em pintos de corte alimentados com dietas contendo compostos bioativos comerciais / Raissa Almeida Silva.- Areia, 2018.

71 p. : il.

Orientação: Oliveira Caetano de Freitas Neto.

Coorientação: Celso José Bruno de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência animal. 2. Pinto de corte - Infecção - *Salmonella Heidelberg*.
3. Nutrição animal - Pintos de Corte. I. Freitas Neto, Oliveira Caetano de. II. Oliveira, Celso José Bruno de. III. Título.

UFPB/BC

RAÍSSA ALMEIDA SILVA

**INFECÇÃO POR *SALMONELLA* HEIDELBERG EM PINTOS DE
CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO
COMPOSTOS BIOATIVOS COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do Brejo
Paraibano.

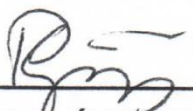
APROVADA EM 28/03/2018

BANCA EXAMINADORA

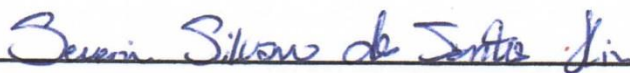


Dr. CELSO JOSÉ BRUNO DE OLIVEIRA
UFPB

Co-Orientador



Dra. PATRÍCIA EMÍLIA NAVES GIVISIEZ
Examinadora



Dr. SEVERINO SILVANO DOS SANTOS HIGINO
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAÍSSA ALMEIDA SILVA– nascida em 28 de abril de 1988, na cidade de Prata, Paraíba. Médica Veterinária formada em outubro de 2015, pela Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba. Durante a graduação foi monitora em duas ocasiões das disciplinas de “Microbiologia Veterinária” e posteriormente de “Reprodução e Obstetrícia Veterinária”. Atuando na área de Patologia Aviária, Segurança Alimentar e Saúde Pública, no Diagnóstico Preventivo, Legislação, Fiscalização e Controle de Qualidade de Produtos de Origem Animal.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu guia, pela força e coragem para superar todas as dificuldades e concretizar meus objetivos;

Aos meus amados pais e irmã, razão da minha vida, pelo amor, responsáveis pela minha formação, obrigada pelo incentivo e força em cada escolha ao longo dos anos. Amo vocês!

Aos meus familiares pelo apoio incondicional, gratidão!

Ao meu noivo pela compreensão, carinho, cumplicidade em todas as horas!

Agradeço ao meu orientador Dr. Oliveira Caetano pela confiança, apoio e orientação em todas as etapas;

Agradeço ao co-orientador Dr. Celso de Oliveira pela oportunidade e aprendizado;

A todos da equipe LAPOA, que auxiliaram no planejamento e execução do projeto;

Aos Laboratórios de Patologia Veterinária e Histologia Animal do CCA/UFPB;

Ao incubatório da Guaraves, pela disponibilidade dos pintos para o projeto;

Agradeço a coordenação PPGCAn, na pessoa do secretário Jozenio pela competência e ao coordenador e prof. Dr. Ricardo Lucena por toda a colaboração.

À Fundação CAPES pelo auxílio financeiro para realização deste projeto e ao incentivo à pesquisa.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 <i>Salmonella</i> spp	2
2.2 <i>Salmonella</i> Heidelberg e Saúde Pública.....	4
2.3 Integridade da Mucosa Intestinal.....	6
2.4 Bioprodutos.....	7
2.4.1 Sanguinarina.....	7
2.4.2 Original XPC™	7
3. OBJETIVOS	8
3.1 GERAL	8
3.2 ESPECÍFICOS	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
1. CAPÍTULO 1 - INFECÇÃO POR <i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG EM PINTOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO COMPOSTOS BIOATIVOS COMERCIAIS.....	22
1.1 RESUMO	23
1.2 ABSTRACT.....	24
1.3 INTRODUÇÃO	25
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26

1.4.1 Aves e Instalações	27
1.4.2 Bactéria	27
1.4.3 Desafio por Contato	28
1.4.4 Delineamento Experimental	28
1.4.5 Quantificação da <i>Salmonella</i> Heidelberg	28
1.4.6 Avaliação Macro e Microscópica.....	29
1.4.7 Análise Estatística	30
1.5 RESULTADOS.....	30
1.5.1 Aves experimentais	30
1.5.2 Avaliação da colonização intestinal e infecção sistêmica.....	30
1.5.2.1 Contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg em conteúdo cecal.....	30
1.5.2.2 Contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg em baço e fígado.....	31
1.5.3 Avaliação Macro e Microscópica.....	33
1.5.4 Histomorfometria do Íleo.....	37
1.6 DISCUSSÃO	38
1.7 CONCLUSÃO	40
1.8 REFERÊNCIAS.....	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	47
ANEXO A – COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA A REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH (IJSR).....	54

SILVA, R.A. **Infecção por *Salmonella* Heidelberg em Pintos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Compostos Bioativos Comerciais**. Areia, 2018. 71p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal da Paraíba, Campus Areia.

RESUMO GERAL

São conhecidos atualmente mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella* spp., sendo que as salmoneloses em humanos podem estar relacionadas ao consumo de carne de aves ou ovos contaminados, além de provocar doença em plantel de aves, acarretando diminuição na produção e consequentemente gerando prejuízos para cadeia produtiva. A *Salmonella* Heidelberg é um sorovar emergente e preocupante para a avicultura e saúde pública, mostrando-se mais invasiva quando comparado a outros sorotipos paratíficos. O uso de antimicrobianos empregados para fins terapêuticos e profiláticos no controle da *Salmonella* spp. na produção avícola pode conduzir à seleção de cepas bacterianas resistentes, no entanto, o seu uso na produção animal pode ser substituído por produtos alternativos com capacidade de reduzir a incidência de enteropatógenos, fornecendo efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro. O capítulo 1 buscou-se avaliar o efeito do bioproduto adicionados à ração, com o intuito de diminuir multiplicação de *Salmonella* Heidelberg. Foram realizadas a avaliação da colonização intestinal e infecção sistêmica, através das contagens de colônias por UFC/g em conteúdo cecal, fígado e baço bem como a avaliação das alterações macroscópicas e microscópicas aos 3, 7 e 14 dpi em fígado, ceco e íleo e mensurados os parâmetros histomorfométricos do íleo como altura de vilo, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de vilosidade em pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg. As menores contagens cecais de SH foram observadas em aves que ingeriram sanguinarina, seguidas daquelas alimentadas com XPC ($P>0,05$). Não houve efeito sinérgico na redução de SH no ceco quando os dois bioprodutos foram adicionados simultaneamente (SANG+XPC). As médias das contagens de SH em fígado e baço não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). De maneira geral, aves de todos

os grupos desafiados com SH apresentaram alterações macroscópicas semelhantes como áreas hemorrágicas, hepato e esplenomegalia, tais alterações foram mais discretas aos 14 dpi. As alterações microscópicas observadas em fígado incluíram congestão de hepatócitos, infiltrado de heterófilos nos sinusóides, áreas de necrose e inflamação mononuclear. Enquanto que no ceco, pôde-se observar infiltrados heterofílico e espessamento de lâmina própria. No íleo as alterações mais encontradas foram congestão de lâmina própria, atrofia de vilosidades, atrofia de cripta e espessamento de lâmina própria. Notou-se que a intensidade de alterações microscópicas foi menor nas aves dos suplementadas com os bioprodutos, quando comparadas as do grupo controle infectado. Aves suplementadas com sanguinarina foram as que menos desenvolveram alterações. Nos parâmetros histomorfométricos do íleo observou-se de maneira geral, ao longo do estudo, médias mais elevadas de altura e área de vilo em aves do grupo controle não infectadas e também do grupo SANG. Enquanto que a profundidade de cripta foi menor em aves do grupo controle negativo. No presente estudo, os resultados indicam que a adição de bioprodutos, sobretudo da sanguinarina, na dieta de aves auxiliou no controle da infecção por SH, reduzindo sua contagem em conteúdo cecal e melhorando aspectos da saúde geral e intestinal das aves.

Palavras-Chave: histopatologia, pintos, *Salmonella* Heidelberg, saúde intestinal

SILVA, R.A. *Salmonella* Heidelberg Infection in Cutting Chicks Fed with Diets Containing Commercial Bioactive Compounds. Areia, 2018. 71p. Dissertation (Master degree) - Federal University of Paraíba, Campus Areia.

ABSTRACT

More than 2.600 serotype of *Salmonella* spp. A known today, and salmonellosis in humans may be related to the consumption contaminated of poultry eggs, as well as causing disease in poultry, causing a decrease in production and consequently increasing proff loss. *Salmonella* Heidelberg is an emerging and worrying serotype for poultry and public health, and is more invasive when compared to other paratyphoid serotypes. The use of antimicrobials used for therapeutic and prophylactic purposes in the control of *Salmonella* spp. in poultry production may lead to the selection of resistant bacterial strains; however, its use in animal production may be replaced by alternative products capable of reducing the incidence of enteropathogens, providing beneficial effects on host health. Chapter 1 sought to evaluate the effect of the bioproduct added to the feed, in order to decrease *Salmonella* Heidelberg multiplication. The intestinal colonization and systemic infection were evaluated through colony counts by CFU / g in cecal, liver and spleen contents, as well as the evaluation of macroscopic and microscopic alterations at 3, 7 and 14 dpi in liver, cecum and ileum and the ileus histomorphometric parameters such as height of villi, depth of crypt, villus: crypt and villus area in cut chicks challenged with *Salmonella* Heidelberg were measured. The lowest cecal SH counts were observed in birds that ingested sanguinarin, followed by those fed with XPC ($P > 0.05$). There was no synergistic effect on SH reduction in the cecum when both bioproducts were added simultaneously (SANG + XPC). Mean scores for SH in liver and spleen did not differ between groups ($P > 0.05$). In general, birds from all groups challenged with HS presented similar macroscopic alterations such as hemorrhagic areas, hepato and splenomegaly; such changes were more discrete at 14 dpi. Microscopic changes observed in liver included congestion of hepatocytes, infiltration of heterophiles in the sinusoids, necrosis areas of mononuclear

inflammation. While in the cecum, heterophilic infiltrates and thickening of lamina propria could be observed. In the ileum the most frequent changes were congestion of lamina propria, atrophy of villi, atrophy of crypt and thickening of lamina propria. It was observed that the intensity of microscopic changes was lower in the birds supplemented with the bioproducts, when compared to the infected control group. Birds supplemented with sanguinarine were the ones that developed the least changes. In the histomorphometric parameters of the ileum, it was generally observed throughout the study, higher mean height and villus area in birds from the uninfected control group and also from the SANG group. While the crypt depth was lower in birds of the negative control group. In the present study, the results indicate that the addition of bioproducts, mainly sanguinarin, in the diet of birds assisted in the control of SH infection, reducing its count in cecal content and improving aspects of bird general and intestinal health.

Key -words: histopathology, chicks, *Salmonella* Heidelberg, intestinal health

LISTA DE ABREVIATURAS

AV:	Altura de vilosidade
°C:	Celsius
cm:	Centímetro
C +	Controle positivo
C -	Controle negativo
Dpi:	Dias pós-infecção
et al.:	colaboradores do autor
g:	gramas
HE:	Hematoxilina – Eosina
Log ₁₀ :	Logaritmo na base de 10
IgA:	Imunoglobulina A
IgM:	Imunoglobulina M
LV:	Largura de vilosidade
Kg	Quilograma
mm:	milímetro
mm ² :	milímetro quadrado
mL:	mililitro
NBF:	Formol Neutro Tamponado
Naf:	Resistência ao Ácido Nalidíxico
PBS:	Tampão fosfato-salino
pH:	Potencial Hidrogeniônico
SH:	<i>Salmonella</i> Heidelberg

SANG: Sanguinarina

xiv

Subsp. Subespécie

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

Ton Toneladas

UFC: Unidade Formadora de Colônia

VB: Ágar Verde Brilhante

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental	28
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Média do número viável de unidades formadoras de colônias (Log10 UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em conteúdo cecal de pintainhos de corte experimentalmente infectados no segundo dia de vida e submetidos a tratamentos com bioprodutos. Amostras de 3, 7 e 14 dias pós-infecção. Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$).....31
- Figura 2:** Média do número viável de unidades formadoras de colônias (Log10 UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em baço de pintainhos de corte experimentalmente infectados no segundo dia de vida e submetidos a tratamentos com bioprodutos. Amostras de 3, 7 e 14 (dpi). Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$)32
- Figura 3:** Média do número viável de unidades formadoras de colônias (Log10 UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em fígado de pintainhos de corte experimentalmente infectados no segundo dia de vida e submetidos a tratamentos com bioprodutos. Amostras de 3, 7 e 14 (dpi). Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$)32
- Figura 4:** Fotomicrografia de infiltrados de heterófilos (setas) na lâmina própria do ceco de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg submetidos a diferentes tratamentos. (A) Grupo XPC aos 3 dpi. (B) Grupo SANG aos 7 dpi. (C) Grupo controle positivo aos 3 dpi. (D) SANG + XPC aos 7 dpi. HE, objetiva 40x.....34
- Figura 5:** Fotomicrografia de fígados de pintainhos de corte aos 3 dias pós-infecção com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Infiltração mononuclear leve (seta) no grupo controle positivo. (B) Focos discretos de infiltrados heterófilos e necrose de hepatócitos (seta) no grupo SANG. (C) Inflamação mononuclear moderada (seta) no grupo XPC. (D) Infiltrado inflamatório leve (seta) no grupo SANG + XPC. HE, Objetiva 40x35
- Figura 6:** Fotomicrografia de fígado de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Congestão moderada em fígado (setas) aos 3 dpi, grupo SANG. HE, objetiva 10 x. (B) Congestão

leve em sinusóides hepaticos (setas) no grupo XPC aos 7 dpi. HE, objetiva 20x.....35

xvii

Figura 7: Fotomicrografia de fígado de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Área de necrose com foco inflamatório mononuclear difuso de hepatócitos (seta) no grupo SANG aos 7 dpi. (B) Infiltrado inflamatório composto por heterófilos perivascularares com macrófagos predominantes no espaço periportal (setas) no grupo controle aos 14 dpi. (C) Focos de infiltrado inflamatório leve composto por macrófagos (seta) no grupo SANG aos 7 dpi. (D) Infiltrados de heterófilos nos sinusóides hepáticos (seta) no grupo SANG+XPC aos 14 dpi. HE, objetiva 40x.....36

Figura 8: Fotomicrografia do íleo de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg. Nota-se congestão acentuada na lâmina própria (setas) em aves do grupo XPC aos 14 dpi. HE, objetiva 20x37

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Salmonellas spp. são bacilos Gram-negativos, intracelulares, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e não formadores de esporos bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, são amplamente difundidas na natureza e capazes de infectar tanto o homem quanto os animais

O gênero *Salmonella* spp. causa uma infecção que ocupa posição de destaque em saúde pública pelas suas características de endemicidade, morbidade e pela dificuldade de controle, sendo que sua patogenicidade varia de acordo com a idade e condições de saúde do hospedeiro. Dessa forma, o controle da salmonelose representa um grande desafio ao setor avícola, principalmente pela diversidade e emergência de novos sorovares inespecíficos e pela sua relação com a saúde pública.

A principal forma de controle da *Salmonella* spp. na produção avícola relaciona-se a elaboração de um criterioso e específico programa de biossegurança envolvendo todos os elos da cadeia avícola (reprodutoras, incubatórios, fábricas de ração, granjas, e abatedouros). Associadas a isso, várias ferramentas têm sido empregadas como uso de antibióticos, prebióticos, probióticos e vacinação. Entretanto, o uso de antibióticos para controle das salmoneloses na produção demonstrou-se pouco eficiente e ainda, provocou o aparecimento de cepas resistentes.

Nas últimas décadas, os produtores avícolas têm buscado diferentes alternativas ao uso de antibióticos para promover melhor saúde intestinal e, assim, melhorar seus rendimentos. Os metabólitos à base de compostos alternativos na suplementação animal melhoram o balanço do sistema imune, reforçam a saúde digestiva e ajudam não só a eliminar patógenos, como também a reduzir a resistência aos antibióticos desenvolvidos por várias bactérias devido ao uso indiscriminado na produção animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp é composto por à família Enterobacteriaceae pelas espécies *enterica* e *bongori*. A espécie *enterica* está segmentada em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A subespécie *enterica* inclui sorotipos paratíficos relacionados com a ocorrência de salmoneloses aviárias, como por exemplo: Enteritidis, Heidelberg, Typhimurium, Kentucky e Hadar (ANDREATTI FILHO, 2007). Os nomes foram mantidos somente para os sorovares da subespécie *enterica* e devem ser escritos com a primeira letra maiúscula e não devem ser de forma itálica (POPOFF; LE MINOR, 1997).

São conhecidos atualmente mais de 2600 sorotipos de *Salmonella*, entre eles, estão os principais sorotipos causadores de salmoneloses aviárias e doenças alimentares em humanos (BERCHIERI JR; FREITAS NETO, 2009).

Este grande número de sorotipo pode ser dividido em duas classes gerais. A primeira compreende um pequeno número de sorotipos espécie-específicos, que incluem *S. Gallinarum* e *Pullorum* nas aves (BARROW; FREITAS NETO, 2011), *S. Typhi* nos humanos, *S. Dublin* em bovinos e *S. Cholerasuis* em suínos. Estes sorotipos são transmitidos por via fecal-oral, apresentam baixa colonização intestinal e se multiplicam em outros órgãos como fígado e baço. Após esta multiplicação podem voltar a colonizar o intestino na presença de doença clínica e, por consequência, raramente entram na cadeia alimentar humana (UZZAU et al., 2000; BARROW; FREITAS NETO, 2011).

A segunda classe engloba os sorotipos paratíficos capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo o homem e as aves. Estes raramente provocam doença sistêmica em indivíduos saudáveis, mas são capazes de colonizar o intestino sem a presença de sinais clínicos, sendo então relacionados a contaminação de produtos de origem animal e doenças transmitidas por alimentos em humanos. Este grupo compreende os sorotipos não espécie-específicos, como *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH), *S. Minnesota* (SM) e muitos outros (BARROW; FREITAS NETO, 2011).

A infecção com *Salmonella enterica* em humanos é uma das doenças transmitidas por alimentos mais importantes no mundo, por apresentar alta complexidade relacionada a endemicidade, diagnóstico, ampla variedade do agente infeccioso, múltiplas fontes de infecção e difícil controle. Muitos fatores influenciam a colonização da *Salmonella* spp. em frangos como idade e susceptibilidade genética, imunossupressão, competição do sorotipo com a microbiota por sítios de colonização e dose infectante (ANTUNES et al., 2016; FOLEY et al., 2011).

De acordo com Chappell et al. (2009), as salmoneloses aviárias sistêmicas podem ser divididas em três fases distintas. A primeira seria a invasão intestinal. A segunda, a infecção sistêmica. Na terceira fase, ocorreria a destruição de *Salmonella* spp. presente nos tecidos (ou *clearance*) ou a morte da ave, sendo que em alguns casos a ave se recupera da infecção, mas a bactéria persiste em número reduzido no interior de macrófagos em alguns tecidos.

A maioria das infecções por *Salmonella* spp. em aves se iniciam pela via oral, após ingestão desses micro-organismos, há migração pelo trato alimentar, interagindo com a superfície da mucosa provavelmente nas células dendríticas e células M sobrepostas aos agregados linfóides, com consequente adesão e penetração nas células epiteliais intestinais (SUZUKI, 1994; IQBAL et al., 2005; CHAPPELL et al., 2009).

Após a invasão, a *Salmonella* spp. é fagocitada por macrófagos ou por células dendríticas e transportada pelo sistema linfático para o fígado e baço, o que seria a chave para o desenvolvimento da infecção sistêmica em aves e mamíferos (BARROW et al., 1994; MASTROENI; MENAGER, 2003).

O intestino delgado é a principal área para invasão de *Salmonella* spp. Em mamíferos, persistem por mais tempo na região do ceco; esta localização pode ser o resultado de fatores não específicos ou do hospedeiro. De acordo com Barrow et al. (1988), a lenta taxa de passagem do conteúdo através do ceco permite a maior multiplicação microbiana, contribuindo com sua persistência. Porém, o íleo tem interesse particular por sua proximidade com o ceco, pois alberga grande população de *Salmonella* spp. em sua microbiota (THOMPSON; APPLGATE; 2006).

As lesões macroscópicas aparecem a partir do quarto dia pós-infecção, no entanto não são patognomônicas. Podem ocorrer focos necróticos na mucosa intestinal, enterite com lesões necróticas focais na mucosa do intestino delgado, espessamento da mucosa cecal, com conteúdo caseoso de coloração branca a branco-amarelado, o baço e fígado apresentam-se congestos e edemaciados, com hemorragias e pontos necróticos

(BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009; BERCHIERI JÚNIOR; BARROW, 1995; CARLTON; MCGAVIN, 1998). Entre as alterações microscópicas pode-se citar, na fase aguda, congestão vascular em vários órgãos como fígado, baço e rins, pontos necróticos no fígado, congestão renal e, nos cecos de aves jovens, extensa necrose da mucosa e submucosa com o lúmen contendo debris celulares necrosados, misturado com fibrina e heterófilos (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A contaminação de subprodutos de origem animal, aves, forros de caixas de pintos de um dia de idade, cama, equipamentos e roedores auxiliam na transmissão horizontal das salmoneloses aviárias (ROCHA et al., 2003). A transmissão vertical é mediada pela presença da *Salmonella* spp. nos folículos reprodutivos da ave, após os poros da casca em contato com fezes contaminadas a eclosão dos ovos a contaminação pode ocorrer pela passagem da bactéria através dos (GANTOIS et al., 2009).

O controle de *Salmonella* spp. na avicultura representa um desafio para a saúde pública, tendo em vista a emergência de novos sorotipos e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países em desenvolvimento quanto naqueles industrializados. Para isso, a indústria deve através de programa de implantação de medidas básicas de biossegurança (SILVA; DUARTE, 2002; PICKLER, 2016; RODRIGUES, 2011), onde o objetivo final é evitar a transmissão vertical e horizontal, diminuindo ao máximo o número de *Salmonellas* spp. no ambiente e, conseqüentemente, a contaminação do produto final (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.2 *Salmonella* Heidelberg e Saúde Pública

A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg pertence ao grupo de *Salmonellas* paratíficas, estas são capazes de causar doença em animais ou em humanos, quando do consumo de carne de frango ou ovos contaminados (BASSANI, 2017). É considerada um dos três principais sorotipos de *Salmonella* spp. relacionadas com doenças transmitidas por alimentos na América do Norte, apresentando maior invasividade nas infecções humanas quando comparado a outros sorotipos (MENCONI et al., 2014).

No Brasil, a *Salmonella* Heidelberg foi identificada como um dos sorotipos mais frequentes envolvidos em surtos de intoxicação alimentar devido ao consumo de ovos e produtos à base de carne, contendo cepas patogênicas (KOTTWITZ et al., 2010).

Souza (2015) salienta que a *Salmonella* Heidelberg é atualmente o sorotipo de maior ocorrência nas análises oficiais de controle realizadas no sul do Brasil. Somente no período de 2012 a 2014, a frequência deste sorotipo foi de 20 a 33% do total de amostras positivas por *Salmonella* sp., sendo o terceiro principal isolado em fazendas comerciais de frango. É considerado um sorotipo emergente capaz de causar infecções em várias espécies animais e no homem (VOSS-RECH et al., 2015; CAMPOS, 2015).

Back (2016) demonstrou que a *Salmonella* Heidelberg é o sorotipo mais isolado no Sul do Brasil, apresentando 44% das amostras positivas. Outros sorotipos encontrados foram: Muenchen (6,7%), Schwarzengrund (5,5%), Livingstone (3,6%), Senftenberg (2,4%), Minnesota (1,8%), Mbandaka (2,5%), Anatum (2,2%) e *S. Infantis* e *S. Agona*, ambas presentes em (1,9%).

Avaliando a presença de *Salmonella* em três frigoríficos do Sul do Brasil, Dickel (2004) detectou 26,7% de positividade média, com 31,7% antes do *chiller* e 20% de carcaças positivas depois da passagem pelo *chiller*. Os sorotipos identificados com a avaliação foram: *S. Heidelberg* (63,9%), *S. Enteritidis* (31,9%), *Salmonella enterica* sorotipo Worthington (2,1%) e *Salmonella enterica* sorotipo Tennessee (2,1%).

Nascimento et al. (1995) estudaram a prevalência da *S. Heidelberg* em indústrias avícolas brasileiras e verificaram que este sorotipo está presente em 15,1% de carcaças e 26,1% em cortes de frango. Borsoi et al. (2006) em um estudo conduzido em abatedouros do sul do Brasil, pesquisou a prevalência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango de corte e verificou a presença de 32% de *S. Enteritidis* e 9% de *S. Heidelberg*.

Rodrigues et al., (2009) avaliaram 15 cepas de *S. Heidelberg*, isoladas de abatedouros, quanto a características de permanência da bactéria em plantas de processamento de aves e verificaram que todas as amostras formavam biofilme em placas de poliestireno, favorecendo a permanência da bactéria no ambiente de abate de aves.

2.3 Integridade da Mucosa Intestinal

As aves recém-nascidas possuem o sistema gastrointestinal imaturo e sofrem processos adaptativos nos processos de digestão e absorção, sendo o intestino delgado a porção mais longa do sistema digestório, responsável pela digestão final do alimento e absorção dos nutrientes (BOLELI et al., 2002).

O desenvolvimento da mucosa intestinal é avaliado por meio de dados morfométricos do tamanho e número de vilos, da profundidade das criptas, altura e número de microvilos do enterócito e da integridade da mucosa ou perda de epitélio (STERZO, 2007).

Quando o intestino responde a algum agente e há desequilíbrio da relação de extrusão (perda celular) e proliferação (mitose), ocorre modificação na altura dos vilos, devido ao aumento no número de células e, conseqüentemente, observa-se um aumento na altura e densidade dos vilos e microvilos, resultando na maior taxa de digestão e absorção. A saúde intestinal das aves está relacionada com maior altura de vilos e relação vilo:cripta estão associadas com boa diferenciação da mucosa intestinal (MAIORKA, 2001; FURLAN; MACARI; LUCHETTI, 2004; JEURISSEN et al., 2002).

A maior profundidade de criptas, de acordo com Hancock (1990), é sugestiva de hiperplasia das células epiteliais, relacionado com maior atividade proliferativa celular e aparecimento de enterócitos imaturos para garantir adequada taxa de renovação epitelial, compensando as perdas nas extremidades das vilosidades.

Distúrbios nas células epiteliais intestinais, causados por algum tipo de estresse calórico, agente patogênico ou substâncias químicas, podem alterar a permeabilidade desta barreira natural, facilitando a invasão de patógenos e outras substâncias nocivas, modificando o metabolismo, a capacidade de digestão e absorção de nutrientes e podem causar inflamações crônicas na mucosa intestinal (HOFSTAD, 1972; PODOLSKY, 1993; OLIVEIRA, 1998).

2.4 Bioprodutos

2.4.1 Sanguinarina

É um alcalóide quaternário de benzofenantridina e protopina extraído de plantas da família Papaveraceae, como a *Sanguinaria canadensis* (PICKLER et al., 2013; MAHADY & BEECHER, 1994; HU et al., 2001; PICKLER, 2016). A erva *Macleaya cordata* é uma fonte de compostos bioativos; seu extrato é utilizado em fitopreparações, devido às suas respostas antimicrobianas e antiinflamatórias. Além disso, possuem propriedades farmacológicas na medicina herbal tradicional chinesa por seu efeito analgésico, antiedêmico, carminativo, depurativo e conter propriedades diuréticas (LIU et al., 2016; ZDARILOVA et al., 2008).

Exerce um amplo espectro de atividades antimicrobianas, por exemplo, inibe o crescimento bacteriano em vários pontos de replicação (MITSCHER et al., 1980; SCHMELLER et al., 1997), melhora a digestão da secreção endógena e enzimática, possui ação antifúngica, atividade citotóxica contra várias células tumorais e inibidores reversíveis da hidrólise enzimática da acetilcolina, tem sido usada para evitar a propagação da indução da atividade inflamatória (NIU et al., 2012; WALTEROVA et al., 1995; SIMANEK et al., 2004).

Quando usado na suplementação animal, aumenta a ingestão de alimentos e conversão alimentar, resultando melhor desempenho em animais na fase de crescimento, reduzindo a degradação de aminoácidos e potencializando os efeitos das enzimas fibrolíticas (KLUTH et al., 2002; TSCHIRNER 2004; RAWLING et al. 2009; SZE & CHWEN, 2011).

2.4.2 Original XPC™

Diamond V Original XPC™ é um bioproduto originado da fermentação do *Saccharomyces cerevisiae* com ação sobre *Salmonella* spp. Inclui fragmentos de parede celular de levedura que contém resíduos de manano-oligossacarídeos e β -glucanos (estimulando o sistema imunológico) que proporcionam proteção da barreira intestinal (DAVIS et al., 2004; FIRMAN et al., 2013; GUYARD-NICOD`EME et al., 2016; LENSING et al., 2012; SPRING et al., 2000; ULLUWISHEWA et al., 2011;).

Atua como modificador da atividade intestinal e quando adicionado à dieta de aves, demonstrou limitar a colonização de *Salmonella* spp. otimizando o sistema

imunológico. Através de estudos tanto *in vivo* como *in vitro*. Além disso, promove a saúde do hospedeiro, estimula o apetite e melhora o desempenho reprodutivo. O produto possui capacidade de promover redução da *Salmonella* spp. e outros patógenos no trato gastrointestinal de aves sem utilizar antibióticos (AL-HOMIDAN; FAHMY, 2007; EL-HUSSEINY et al., 2008; FEYE et al., 2016; GAO et al., 2008; GUYARD -NICOD`EME et al., 2016; IBUKIC et al., 2012; LENSING et al., 2012; LINE et al., 1998; MCINTYRE et al., 2013; OSWEILER et al., 2010; PAIVA et al., 2010; PRICE et al., 2010; ROTO et al., 2017; RUBINELLI et al., 2016).

Estudos revelam que os metabólitos do Original XPCTM promovem efeitos na resposta imune, como induzir a produção de anticorpos antivirais, aumento da IgM e IgA secretora e dos linfócitos T e, além de ter um impacto positivo no ganho de peso, conversão alimentar e mortalidade em frangos de corte (GAO et al., 2008; GAO et al., 2009). Estudos recentes demonstram que XPCTM diminui a susceptibilidade ao estresse térmico em frangos de corte (PRICE et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo teve por avaliar o efeito dos compostos bioativos comerciais, adicionados à ração, sobre a infecção por *Salmonella* Heidelberg em ceco, fígado e baço de pintainhos de corte, bem como as alterações histopatológicas nesses órgãos.

3.2 Específicos

- A) Avaliar a colonização e invasão de cepa de SH em pintos de corte desafiados no 2º dia de vida, por meio de contagens em conteúdo cecal, fígado e baço aos 3, 7 e 14 dpi;
- B) Avaliar o efeito do bioproduto Sanguinarina adicionado à ração sobre a multiplicação de SH em ceco, baço e fígado aos 3, 7 e 14 dpi e alterações histopatológicas nesses órgãos;

- C) Avaliar o efeito do bioproducto Original XPC adicionado à ração sobre a multiplicação de SH em ceco, baço e fígado aos 3, 7 e 14 dias após o desafio e alterações histopatológicas nesses órgãos;
- D) Avaliar o efeito da associação dos bioproductos Sanguinarina + Original XPC adicionado à ração respectivamente, sobre a multiplicação de SH em ceco, baço e fígado aos 3, 7 e 14 dpi e alterações histopatológicas nesses órgãos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HOMIDAN, A.; FAHMY, M. O. The effect of dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on growth performance, carcass chemical analysis, immunity, ileum villi heights, and bacterial counts of broiler chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 27, p. 613– 623, 2007.

ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. **In: Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, p.41-51, 2007.

ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>>. Acesso em: 21 Jan. 2018.

BACK, A. *Salmonella* Heidelberg é líder absoluta entre variantes no sul do país. **O Presente Rural**, 11 de dezembro de 2017. Disponível em: <<http://opresenterural.com.br/noticia/salmonella-heidelberg-e-lider-absoluta-entre-variantes-no-sul-do-pais/8105/>>. Acesso em: 12 Jan. 2018.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. **Avian pathology: Journal of the W.V.P.A.**, Abingdon, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and immunity**, v.62, n.10, p. 4602-4610, 1994.

BARROW P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning *salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03079458808436478>>. Acesso em: 08 Jan. 2018.

BASSANI, J. EFICÁCIA DE SANITIZANTES E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* HEIDELBERG ISOLADAS DE FONTES

AVÍCOLAS EM 2006 E 2016. 2017. 66p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; BARROW, P. A. Patologia e métodos de diagnósticos de *Salmonella* Enteritidis em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1995. p.1- 4.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 435- 453.

BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari M, Furlan RL, Gonzales E, editores. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep, p. 75-96, 2002.

BORSOI, A.; MORAES, H. S.; SALLE, C. T. P.; BETTIOL, G.; E.; LEAL, D. M.; NASCIMENTO, V. P. Sorovares de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas e swab de arrasto. **Rev Brasil Ciênc Avícola**, Santos, 2006. Suplemento.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, p. 351-360, 2015.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. In: ArtMed. **Patologia Veterinária Especial**. Porto Alegre, cap.1, p.86-88, 1998.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; B, JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

DAVIS, M. E.; MAXWELL, C. V.; ERF, G. F.; BROWN, D. C.; WISTUBA, T. J. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 6, p.

1882–1891, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/2004.8261882x>. Acesso em: 28 Dez. 2017.

DICKEL, E. L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate 2004.** 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

EL-HUSSEINY, O. M.; ABDALLAH, A. G.; AND ABDEL-LATIF, K. O. The influence of biological feed additives on broiler performance. **Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 9, p. 862–871, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2008.862.871>>. Acesso em: 05 Jan. 2018.

FEYE, K. M.; ANDERSON, K. L.; SCOTT, M. F.; MCINTYRE, D. R.; CARLSON, S. A. Inhibition of the virulence, antibiotic resistance, intestinal colonization, and fecal shedding of multiple antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium in broilers fed Original XPCTM. **Journal of Poultry Science**, v. 95, n. 2, p. 2902–2910, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.3382/ps/pew254>>. Acesso em: 03 Jan. 2018.

FIRMAN, J. D.; MOORE, D.; BROOMHEAD, J.; MCINTYRE, D. Effects of dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on performance and gut characteristics of male turkeys to market weight. **Journal of Poultry Science**, v.12, n.3, p.141–143, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2013.141.143>>. Acesso em: Jan. 2018.

FOLEY, S. L.; NAYAK, R.; HANNING, I. B.; JOHNSON, T. J.; HAN, J.; RICKE, S. C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p. 4273–4279, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00598-11>>. Acesso em 06 Fev. 2018.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. (2004). Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO

TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO. 2004, Balneário Camboriú, Santa Catarina: **Anais...** p. 6-28.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J.; IMMERSEEL, F. V. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology**. v.33, p.718-738, 2009.

GAO, J.; H. J. ZHANG.; WU, S. G.; YU, S. H.; YOON, I.; MOORE, D.; GAO, Y. P.; YAN, H. J.; AND QI, G. H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. **Journal of Poultry Science**, v. 88, n. 10, p. 2141–2151, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps.2009-00151>>. Acesso em: 07 Jan. 2018.

GAO, J.; ZHANG, H. J.; YU, S. H.; WU, S. G.; YOON, I.; QUIGLEY, J.; GAO, Y. P.; AND QI, G. H. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immune-modulatory functions. **Journal of Poultry Science**, v. 87, n. 7, p.1377–1384, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps.2007-00418>>. Acesso em: 08 Jan. 2018.

GRIMONT, P. A.; AND F. X. WEILL. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre Reference Research of *Salmonella***. 9th Edition, 2007. Disponível em: <<http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20>> Acesso em: 09 Jan. 2018.

GUYARD-NICOD`EME, M. A.; QUESNE, S.; AMELOT, M.; POEZEVARA, T.; LE BERRE, B.; S`ANCHEZ, J.; VESSEUR, P.; MARTIN, `A.; MEDEL, P.; AND CHEMALY, M. Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period. **Journal of Poultry Science**, v. 95, n. 2, p. 298–305, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps/pev303>>. Acesso em: 03 Jan. 2018.

HANCOCK, J.D.; PEO, E.R.J.R.; LEWIS, A. J. ET AL. Effects of etanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. **Journal of Animal Science**, v.68, p. 3244-3251, 1990.

HOFSTAD, M. S. **Diseases of Poultry**. 6 ed. Hofstad, M.S. (ed). Ames: The Iowa State University Press, 1176 p, 1972.

HU, C. M.; CHENG, H. W.; CHENG, Y. W.; KAN, J. J. Mechanisms underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p.47–53, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1254/jjp.85.47>>. 23 Jan. 2018.

IBUKIC, M.; TRAMPEL, D.; FRANA, T.; LOGUE, C. M.; BROOMHEA, J. Evaluation of Diamond V Original XPC for reducing cecal colonization by *Salmonella* Enteritidis in layer pullets. Proc. 93rd Conf. Res. **Work Animal Disease**. Abstract 051P, 2012. Disponível em: <<http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx>>. Acesso em: 09 Jan. 2018.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; SMITH, A. L. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 1-2, p. 117-127, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.11.003>>. Acesso em: 04 Jan. 2018.

JEURISSEN, S. H. M.; LEWIS, F.; KLIS, J. D. V.; MROZ, Z.; REBEL, J. M. J., HUURNE, T. A. A. Parameters and Techniques to Determine Intestinal Health of Poultry as Constituted by Immunity, Integrity and Functionality. **Current Issues of Intestinal Microbiology**, v.3, n.1, p. 1-14, 2002.

KLUTH, H.; SCHULZ, E.; HALLE, I.; RODEHUTSCORD, M. **Zur Wirksamkeit von Kräutern und ätherischen Ölen bei Schwein und Geflügel**. In: Rodehutscord M (ed.), Tagung Schweine- und Geflügelernährung, Martin-Luther-Universität Halle, Wittenberg, p. 66–74, 2002.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D.P.R. Epidemiology of Salmonellosis outbreaks occurred in the period of 1999-2008 in the state of Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.32, n. 1, p. 9-15, 2010.

LENSING, M.; VAN DER KLIS, J. D.; YOON, I.; MOORE, D. T. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intestinal health and productivity of coccidian-challenged laying hens. **Journal of Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 1590–1597, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01508>>. Acesso em: 28 Dez. 2017.

LINE, J. E.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; STERN, N. J.; TOMPKINS, T. (1998). Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. **Journal of Poultry Science**, v. 77, n.3, p. 405–410, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ps/77.3.405>>. Acesso em: 11 Jan. 2018.

LIU, G.; GUAN, G.; FANG, J.; MARTÍNEZ, Y.; CHEN, S.; BIN, P.; DURAI PANDIYAN, V.; GONG, T.; TOSSOU, M.C. B.; AL-DHABI, N. A.; AND YIN, Y. *Macleaya cordata* Extract Decreased Diarrhea Score and Enhanced Intestinal Barrier Function in Growing Piglets. **BioMed Research International**, v. 2016, 7p, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1069585>> Acesso em: 12 Fev. 2018.

MAHADY, G. B.; BEECHER, C. W. Quercetin-induced benzophenanthridine alkaloid production in suspension cell cultures of *Sanguinaria canadensis*. **Planta Medica** v. 60, n.6, p. 553–557, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-2006-959570>>. Acesso em: 13 Jan. 2018.

MAIORKA, A. Adaptações digestivas pós- eclosão. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVICOLAS. Santos, São Paulo. **Anais...**Campinas: FACTA, v. 2, p. 141-151, 2001.

MASTROENI, P.; MENAGER, N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v.52, p. 453-459, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.05173-0>>. Acesso em: 20 Dez. 2017.

MCINTYRE, D.; BROOMHEAD, J.; MATHIS, G. F.; LUMPKINS, B. Effects of feeding Original XPCTM and Salinomycin during a coccidia challenge in broilers. **Journal of Poultry Science**, v. 92, n. 1, p. 59–60, 2013.

MENCONI, A.; KALLAPURA G.; LATORRE J. D.; MORGAN M. J.; PUMFORD N. R.; HARGIS B. M.; TELLEZ G. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria in a Commercial Probiotic Culture. **Bioscience Microbiota Food Health**, v. 33, n.1, p.25-30, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.12938/bmfh.33.25>>. Acesso em: 08 Jan. 2018.

MITSCHER, L. A.; PARK, Y. H.; CLARK, D.; CLARK, G. W.; HAMMESFAHR, P.D.; WU, W.N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants: an investigation of *Hunnemannia fumariaefolia* pseudoalcoholates of sanguinarine and chelerythrine. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 2, p.259–269, 1980.

NASCIMENTO, V. P. Salmonelose aviárias: uma revisão. In: Simpósio de Produção de Matrizes de Corte, 1. **Anais...** Chapecó: 1995. p.51-61.

NIU, X.; FAN, T.; LI, W.; XING, W.; HUANG, H. The anti-inflammatory effects of sanguinarine and its modulation of inflammatory mediators from peritoneal macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 262–269, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.039>>. Acesso em: 16 Jan. 2018.

OLIVEIRA, P.B. **Influência de fatores antinutricionais de alguns alimentos sobre o epitélio intestinal e o desempenho de frangos de corte.** (1998). 42p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

OSWEILER, G. D.; JAGANNATHA, S.; TRAMPEL, D. W.; IMERMAN, P. M.; ENSLEY, S. M.; YOON, I.; et al. Evaluation of XPC and prototypes on aflatoxin-challenged broilers. **Journal of Poultry Science**, v. 89, n. 9, p. 1887–1893, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps.2010-00773>>. Acesso em: 13 Jan. 2018.

PAIVA, D. M.; WALK, C. L.; LEHMAN, R.; SOTTOSANTI, J. R.; HONAKER, C. F.; MOORE, D. T.; AND MCELROY, A. P. Turkey response to the inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product, Original XPC, in antibiotic free diets following a coccidian vaccination. **Journal of Poultry Science**, v. 89 (E. Suppl. 1), p. 283-284, 2010.

PICKLER, L. **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO TRATO GASTRINTESTINAL DE FRANGOS DESAFIADOS COM *Salmonella enterica*: USO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS**. 2016. 122p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná.

PICKLER, L.; BEIRAO, B. C. B; HAYASHI, R M.; DURAU, J. F.; LOURENCO, M. C.; CARON, L. F.; SANTIN, E. Effect of sanguinarine in drinking water on *Salmonella* control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 430-438, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/japr.2012-00649>>. Acesso em: 06 Jan 2018.

PODOLSKY, D.K. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. **Animal Journal Physiologic**, v. 264, (2 Pt 1), p. G179-G186, 1993. Disponível em:< <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1993.264.2.G179>>. Acesso em: 15 Dez. 2017.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. **Formules antiïgeniques des serovars de *Salmonella***. Paris: WHO. 1997. P.1-15.

PRICE, K. L.; TOTTY, H. R.; LEE, H. B.; UTT, M. D.; FITZNER, G. E.; YOON, I.; PONDER, M. A, ESCOBAR, J. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 12, p. 3896–3908, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2009-2728>>. Acesso em: 18 Jan. 2018.

PRICE, P. T.; BYRD, J. A.; ALVARADO, C. Z.; PAVLIDIS, H. O.; MCINTYRE, D. R.; ARCHER, G. S. Utilizing original XPCTM in feed to reduce stress susceptibility of

broilers. **Journal of Poultry Science**, v. 97, n. 3, p. 855–859, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex386>>. Acesso em: 19 Jan. 2018.

RAWLING, M.D.; MERRIFIELD, L.D.; DAVIES J.S. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. **International Journal of Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 118–122, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.005>>. Acesso em: 02 Jan. 2018.

ROCHA, T. P. et al. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.6, p.672-676, 2003.

RODRIGUES, D. P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: MEMORIA DEL SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE SALMONELOSE AVIAR, 2011, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2011. p.1-7. 1 CD-ROM.

RODRIGUES, L. B. SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; OLIVEIRA, A. P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S. C.; TAGLIETI, R. M.; DICKEL, E. L.; NASCIMENTO, V. P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Sci Vet**, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.

ROTO, S. M.; PARK, S. H.; LEE, S. I.; KALDHONE, P.; PAVLIDIS, H. O.; FRANKENBACH, S. B.; MCINTYRE, D. R.; STRIPLIN, K.; BRAMMER, L.; AND RICKE, S. C. Effects of feeding Original XPCTM to broilers with a live coccidiosis-vaccine under industry conditions: Part 1. Growth performance and *Salmonella* inhibition. **Journal of Poultry Science**, v. 96, n.6, p. 1831-1837, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew445>>. Acesso em: 24 Jan. 2018.

RUBINELLI, P.; ROTO, S.; KIM, S. A.; PARK, S. H.; PAVLIDIS, H. O.; MCINTYRE, D., et al. Reduction of *Salmonella* Typhimurium by fermentation metabolites of Diamond V original XPC in an in vitro anaerobic mixed chicken cecal culture. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 83, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00083>>. Acesso em: 20 Jan. 2018.

SCHMELLER, T.; LATZ-BRUNING, B.; WINK, M. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. **Phytochem**, v. 44, n. 2, p. 257–266, 1997.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2 p. 85-100, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2002000200001>>. Acesso em 22 Dez. 2017.

SIMANEK, V.; ZDARILOVA, A.; ULRICHOVA, J. Sanguinarine and chelerythrine: chemical behaviour and biological activities. **Annales of Polish Chemical Society**, v. 3, p. 613–616, 2004.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella* challenged broiler chicks. **Journal of Poultry Science**, v. 79, n. 2 p. 205–211, 2000.

STERZO, E. V. **Avaliação morfológica do intestino e hematológica de aves de corte (*Gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente por *Salmonella* enteritidis e submetidos ao tratamento por exclusão competitiva.** 2007. 121p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella* enteritidis in poultry. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.21, n.1-2, p.89-105, 1994. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90203-8](https://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)90203-8)>. Acesso em 26 Jan. 2018.

SZE, E. K.; CHWEN, L. T. Effect of feeding feed enzymes with phytogetic compounds on feed nutrient utilization in broiler chickens. In: 4th Int. Conf. Anim. Nutr., 4th ICAN 2010: Sustainable Feeds – Maximizing Productivity and Profitability, 21–23 September 2010, **Persada Johor International Convention Centre**, Johor Bahru, Malaysia. p. 389-392, 2011.

THOMPSON, K. L.; APPLGATE, T. J. Feed withdrawal alters small- intestinal morphology and mucus of broiler. **Journal of Poultry Science**, v.85, n. 9, p. 1535-1540, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ps/85.9.1535>>. Acesso em: 23 Dez. 2017.

TSCHIRNER, K. **Untersuchungen zur wirksamkeit und zum nachweis des pflanzlichen alkaloids sanguinarin beim schwein**. 2004. [dissertation]. Kiel: Christian Albrechts Universität Kiel.

ULLUWISHEWA, D.; ANDERSON, R. C.; MCNABB, W. C.; MOUGHAN, P. J.; WELLS, J. M.; ROY, N. C. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 769–776, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>>. Acesso em: 27 Jan. 2018.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.125, n.2, p.229-255, 2000.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. Á.; RODRIGUES, D. P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Journal of Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps/peu081>>. Acesso em: 24 Jan. 2018.

WALTEROVA, D.; ULRICHOVA, J.; VALKA, I.; VICAR, J.; VAVRECKOVA, C.; TABORSKA, E.; HARKRADER, R. J.; MEYER, D. L.; CERNA, H.; SIMANEK, V. Benzo[c] phenatridine alkaloids of sanguinarine and chelerythrine: biological activities and dental care applications. **Acta. Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae**, v. 139, p. 7–16, 1995.

ZDARILOVA, A.; VRUBLOVA, E.; VOSTALOVA, J.; KLEJDUS, B.; STEJSKAL, D.; PROSKOVA, J.; et al. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3721, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.054>>. Acesso em: 04 Jan. 2018.

1. CAPÍTULO 1: INFECÇÃO POR *SALMONELLA* HEIDELBERG EM PINTOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO COMPOSTOS BIOATIVOS COMERCIAIS

SALMONELLA HEIDELBERG INFECTION IN CUTTING CHICKS FED WITH DIETS CONTAINING COMMERCIAL BIOACTIVE COMPOUNDS

(Encaminhado para publicação à revista International Journal of Science and Research)

Raíssa Almeida Silva¹, Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho³, Mônica Shinneider de Sousa¹, Eudes Fernando Alves da Silva², Ricardo Barbosa de Lucena¹, Patrícia Emília Naves Givisiez³, Celso José Bruno de Oliveira¹, Oliveira Caetano de Freitas Neto¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, (PPGCAn) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB, Brasil.

³Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB, Brasil.

1.1 RESUMO

Salmonella Heidelberg (SH) é responsável por perdas econômicas na avicultura e também por infecções alimentares em humanos. Recentemente, tem sido observada elevação na frequência de isolamento desse sorotipo em lotes de frangos de corte criados no Brasil. Embora o uso de antibióticos ainda seja empregado no controle de *Salmonella* spp. em criações aves, há uma tendência mundial em reduzir ou banir essa prática. Portanto, se faz necessária a busca por métodos alternativos, como por exemplo, bioprodutos que possam auxiliar no controle de *Salmonella* spp. Diante do exposto, elaborou-se o presente estudo, o qual objetivou avaliar o efeito de dietas contendo sanguinarina e/ou XPC na infecção por SH em pintainhos de corte. Para isso, avaliou-se a colonização de SH no ceco e sua invasão em baço e fígado, bem como as alterações histopatológicas provocadas nesses órgãos. As menores contagens cecais de SH foram observadas em aves que ingeriram sanguinarina, seguidas daquelas alimentadas com XPC ($P>0,05$). Não houve efeito sinérgico na redução de SH no ceco quando os dois bioprodutos foram adicionados simultaneamente (SANG+XPC). As médias das contagens de SH no fígado e baço não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). De maneira geral, aves de todos os grupos desafiados com SH apresentaram alterações macroscópicas semelhantes como áreas hemorrágicas, hepato e esplenomegalia, tais alterações foram mais discretas aos 14 dpi. As alterações microscópicas observadas em fígado incluíram congestão de hepatócitos, infiltrado de heterófilos nos sinusóides, áreas de necrose e inflamação mononuclear. No ceco, pôde-se observar infiltrado heterofílico e espessamento de lâmina própria. No íleo, as alterações mais encontradas foram congestão de lâmina própria, atrofia de vilosidades, atrofia de criptas e espessamento de lâmina própria. Notou-se que a intensidade de alterações microscópicas foi menor nas aves dos suplementadas com os bioprodutos, quando comparadas as do grupo controle infectado. Aves suplementadas com sanguinarina foram as que menos desenvolveram alterações. Nos parâmetros histomorfométricos do íleo, observou-se, de maneira geral, ao longo do estudo, médias mais elevadas de altura e área de vilo em aves do grupo controle não infectadas e também do grupo SANG. A profundidade de cripta foi menor em aves do grupo controle negativo. No presente estudo, os resultados indicam que a adição de bioprodutos, sobretudo da sanguinarina, na dieta de aves auxiliou no controle da infecção

por SH, reduzindo sua contagem em conteúdo cecal e melhorando aspectos da saúde geral e intestinal das aves.

Palavras-chave: aves; sanguinarina; saúde intestinal; paratifo aviário; XPC.

1.2 ABSTRACT: *Salmonella* Heidelberg (SH) is responsible for economic losses in poultry and also for food infections in humans. Recently, it has been observed an increase in the frequency of isolation of this serotype in lots of broiler chickens reared in Brazil. Although the use of antibiotics is still employed in the control of *Salmonella* spp. in bird breeding, there is a worldwide tendency to reduce or ban this practice. Therefore, it is necessary to search for alternative methods, such as bioproducts that may aid in the control of *Salmonella* spp. In view of the above, the present study was developed, which aimed to evaluate the effect of diets containing sanguinarin and / or XPC on SH infection in cutting chicks. For this, the colonization of SH in the cecum and its invasion in spleen and liver, as well as the histopathological changes provoked in these organs were evaluated. The lowest cecal SH counts were observed in birds that ingested sanguinarin, followed by those fed with XPC ($P > 0.05$). There was no synergistic effect on SH reduction in the cecum when both bioproducts were added simultaneously (SANG + XPC). Mean of SH counts in the liver and spleen did not differ between groups ($P > 0.05$). In general, birds from all groups challenged with HS presented similar macroscopic alterations such as hemorrhagic areas, hepato and splenomegaly, such changes were more discrete at 14 dpi. Microscopic changes observed in the liver included hepatocyte congestion, heterophil infiltrates in the sinusoids, areas of necrosis and mononuclear inflammation. In the cecum, it was possible to observe heterophilic infiltrate and thickening of lamina propria. In the ileum, the most frequent alterations were congestion of lamina propria, atrophy of villi, atrophy of crypts and thickening of lamina propria. It was observed that the intensity of microscopic changes was lower in the birds supplemented with the bioproducts, when compared to the infected control group. Birds supplemented with sanguinarine were the ones that developed the least changes. In the histomorphometric parameters of the ileum, we observed, in general, throughout the study, higher mean height and villus area in birds from the uninfected control group and also from the SANG group. The crypt depth was lower in birds of the negative control group. In the present study, the results indicate that the addition of bioproducts, mainly

sanguinarin, in the diet of birds assisted in the control of SH infection, reducing its count in cecal content and improving aspects of bird general and intestinal health.

Key-words: birds; sanguinarine; intestinal health; paratyphoid; XPC.

1.3 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. são bastonetes Gram-negativos com metabolismo aeróbio facultativo, pertencentes à família Enterobacteriaceae. O gênero é dividido nas espécies *enterica* e *bongori*, que agrupam mais de 2600 sorovares. Cerca de 90 sorotipos de *Salmonella* spp. podem mais comumente causar o paratifo aviário. Esta enfermidade é capaz de desencadear inflamação intestinal, infecção sistêmica transitória, intensa colonização intestinal e elevada taxa de excreção fecal (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

O paratifo aviário acomete principalmente aves jovens, podendo piorar os índices zootécnicos do lote. No entanto, alguns sorotipos paratíficos podem provocar infecção assintomática (GAST et al., 2013). A intensa excreção fecal dessas bactérias pelas aves favorece a contaminação de ovos e carcaças e, com isso, há ocorrências de surtos de infecção alimentar em humanos (BARROW; WALLIS, 2000).

Anualmente ocorrem cerca de 80,3 milhões de casos de infecção alimentar em humanos por *Salmonella* spp. (MAJOWICZ et al., 2010). Em 2014, nos Estados Unidos da América, os sorotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* foram alguns dos mais frequentes isolados de pessoas com salmonelose (CDC, 2017). As infecções por *S. Heidelberg* em humanos variam de diarreia leve a doença sistêmica grave (CHITTICK et al., 2006; ZHAO et al., 2006).

Estudos realizados no Brasil indicam que *S. Heidelberg* é também um sorotipo emergente no país (COLLA et al., 2012; PULIDO-LANDINEZ et al., 2013; FIO-CRUZ, dados não publicados), descrito como o terceiro mais isolado em suabes provenientes de aviários comerciais (VOSS-RECH et al., 2015).

Embora o uso de antibióticos ainda seja empregado de maneira profilática no controle de *Salmonella* spp. em criações aves, há uma tendência mundial em reduzir ou banir essa prática, uma vez que tem se mostrado ineficiente na diminuição desse patógeno (EVANS; WEGENER, 2003), podendo ainda levar a resistência bacteriana (BARROW; WALLIS, 2000; IWAMOTO et al., 2017). Portanto, se faz necessária a busca por métodos alternativos, como por exemplo, bioprodutos que possam auxiliar no controle de *Salmonella* spp.

A utilização de ferramentas tais como prebióticos, probióticos, produtos de exclusão competitiva, ácidos orgânicos incorporados em água ou ração, como parte de um rigoroso e complexo programa de biossegurança envolvendo os diferentes elos da cadeia avícola, a utilização seria crucial para o controle de *Salmonella* spp. na produção de carne e ovos (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A sanguinarina é um alcalóide obtido da extração de plantas da família Papaveraceae, como a *Sanguinaria canadensis* (MAHADY; BEECHER, 1994). De acordo com Pickler et al. (2013), a sanguinarina reduziu a colonização cecal de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte experimentalmente desafiados, além de auxiliar na modulação da imunidade intestinal. O Original XPCTM é um bioproduto originado da fermentação do *Saccharomyces cerevisiae* com ação sobre *Salmonella* spp. Sua utilização reduziu a presença de *Salmonella* Typhimurium em fezes cecais de frangos de corte e ainda favoreceu o estabelecimento de uma flora intestinal mais saudável (PARK et al., 2017).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos compostos bioativos comerciais, adicionados à ração, sobre a infecção por *Salmonella* Heidelberg em ceco, fígado e baço de pintainhos de corte, bem como as alterações histopatológicas nesses órgãos.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados na pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, sob o protocolo nº 140/2017, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os experimentos foram realizados em instalações do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, Paraíba.

1.4.1 Aves e Instalações

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados 150 pintainhos de corte de lote misto de um dia de idade da linhagem COBB® (Cobb-Vantress Brasil Ltda), obtidos de um incubatório privado. No momento da chegada, colheram-se amostras de mecônio das caixas de transporte para pesquisa de *Salmonella* spp. de acordo com metodologia descrita por Zancan et al. (2000).

As salas experimentais foram previamente limpas e desinfetadas. As aves foram alojadas em caixas de papelão com dimensões de 80 x 50 x 50 cm. Todas as caixas foram previamente forradas com papel Kraft coberto com 5 cm de cama de maravalha autoclavada. A abertura das mesmas recebeu proteção de malha de nylon para evitar contaminação por moscas. Todas foram equipadas com bebedouros e comedouros. Durante o período experimental as aves receberam aquecimento elétrico apropriado, água e ração *ad libitum*. A dieta experimental foi elaborada com farelo de milho e farelo de soja para a fase inicial, seguindo as recomendações nutricionais estipuladas por Rostagno et al. (2011), sem a adição de promotores de crescimento e anticoccidianos.

Adição dos compostos bioativos comerciais, a dose de todos os compostos utilizados neste estudo seguiram as recomendações de cada fabricante.

1.4.2 Bactéria

Foi utilizada uma estirpe da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg (de maneira simplificada *Salmonella* Heidelberg ou SH) com resistência induzida ao ácido nalidíxico (100 µg/mL), gentilmente cedida pelo Prof. Angelo Berchieri Junior do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. O isolado foi semeado em ágar verde brilhante (OXOID, UK) a 37°C por 24 horas. Uma colônia isolada foi então inoculada em 40 ml caldo nutriente (ACUMEDIA, US) e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas sob agitação.

Uma alíquota de 0,1 mL da cultura de SH foi diluída em 0,9 mL de PBS, posteriormente diluída em série decimal em ágar verde brilhante (Acumedia®, EUA) contendo NAL (100 µg/mL), com posterior incubação a 37°C, sendo posteriormente

realizada a contagem das unidades formadoras de colônias. A cultura continha 1×10^8 UFC de SH/mL.

1.4.3 Desafio por Contato

Com intuito de mimetizar a transmissão que ocorre a campo, realizou-se o desafio por contato. Para isso, 6 das 30 aves de cada grupo (com exceção das aves do grupo 1) foram infectadas experimentalmente por via intra-esofágica com 0,5 mL de cultura contendo 1×10^8 de SH aos 2 dias de vida. Em seguida, as aves infectadas foram identificadas com anilhas de marcação e reintroduzidas ao grupo (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

1.4.4 Delineamento Experimental

Os 150 pintainhos foram aleatoriamente divididos em 5 grupos de 30 aves (Tabela 1). Cada caixa recebeu 15 aves, resultando em duas caixas por grupo.

Tabela 1. Delineamento experimental

GRUPO	TRATAMENTO
C-	Ração sem suplementação e sem desafio.
C+	Ração sem suplementação + desafio com SH por contato
SANG	Ração suplementada com Sanguinarina concentração de 100g/ton + SH por contato
XPC	Ração com Original XPC na concentração de 1,25 g/kg + SH por contato
SANG+XPC	Ração suplementada com Sanguinarina + Original XPC nas concentrações de 100g/ton e 1,25 g/kg + SH por contato

1.4.5 Quantificação de *Salmonella* Heidelberg

Para a avaliação da colonização cecal e infecção sistêmica, cinco aves de cada grupo foram eutanasiadas por deslocamento cervical aos 3, 7, 14 dias pós-infecção (dpi). Durante a necropsia colheu-se assepticamente parte do conteúdo cecal e fragmentos de

baço e fígado de todos os animais abatidos por tratamento. As amostras colhidas de baço e fígado foram maceradas e o conteúdo cecal homogeneizado em solução salina tamponada pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. Em seguida realizou-se a diluição seriada decimalmente em PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, espalhando em placas de petri contendo verde brilhante acrescido de ácido nalidíxico na concentração de 100µg/mL de meio (VB Nal). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O número de colônias por grama de órgão foi convertido em log10 para análise dos resultados. Na ausência de colônias, aos respectivos frascos contendo as amostras homogeneizadas em PBS (1:10), foi adicionado igual volume de Caldo Selenito (OXOID, UK), e posteriormente incubados e semeados em VB Nal. A ausência de SH em aves do grupo controle negativo foi confirmada por meio de suabes cloacais realizados nas aves durante as três coletas.

1.4.6 Avaliação Macro e Microscópica

Durante a necropsia avaliou-se as alterações macroscópicas. Para análise das alterações microscópicas, foram realizados cortes histopatológicos de fígado, ceco e íleo nos dias 3, 7 e 14 dpi de cinco aves de cada grupo.

O material coletado foi fracionado e mergulhado em uma solução de formol a 10% neutro tamponado (NBF) na proporção de 10:1 (solução de formaldeído: fragmento de órgãos), permanecendo por 48 horas. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados por xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (LEICA RM 2255) ajustado para 4 µm, os quais foram em seguida, corados segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

A intensidade das lesões microscópicas observadas nas amostras de cecos, fígados e íleos, foram classificadas considerando escores de 0 a 3; foi atribuído escore 0 para ausência de lesão, 1 para alterações discretas, 2 para alterações moderadas e 3 para alterações acentuadas. As imagens de alterações histopatológicas foram capturadas com câmera OLYMPUS SC30 acoplada ao microscópio óptico usando um software de análise de imagem (OLYMPUS Stream 2.2).

Para a análise histomorfométrica do íleo foram utilizados cinco animais por tratamento, por idade de amostragem. Foram avaliadas a altura de vilosidade, profundidade de cripta e área de vilosidade, as medidas foram capturadas pela câmera

(OLYMPUS DP73) acoplada ao microscópio óptico através de um software de imagem (Motic Image Plus 2.0).

Para cada animal foram efetuadas 10 mensurações, totalizando 50 por tratamento para cada variável estudada. A partir dos resultados obtidos para altura de vilosidade e profundidade de cripta, procedeu-se o cálculo da relação vilosidade: cripta. A área da vilosidade foi calculada a partir dos dados de largura de vilosidade (LV) e altura de vilosidade (AV), de acordo com a equação descrita por Hardin et al., (1999): Área (mm²) = altura do vilo (mm) x largura a 50% da altura do vilo (mm).

1.4.7 Análise Estatística

As médias das contagens de SH em unidades formadoras de colônias (UFC) foram convertidas em log10 e comparadas pelo teste Tukey com auxílio do programa estatístico Assistat®, considerando o nível de 5% como significativo ($P < 0,05$). Para as análises de histomorfometria do íleo, as médias foram submetidas à análise de variância e em seguida comparadas pelo Tukey com nível de 5% de significância.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Aves experimentais

Os suabes de fundo de caixa realizados no momento da chegada das aves foram negativos para *Salmonella* spp.

1.5.2 Avaliação da colonização intestinal e infecção sistêmica

1.5.2.1 Contagem de *Salmonella* Heidelberg em conteúdo cecal (colonização intestinal)

As médias das contagens bacterianas em conteúdo cecal seguidas dos desvios padrão estão disponíveis no material suplementar (Tabela S1). A figura 1 contém dados referentes às contagens microbiológicas no conteúdo cecal de pintainhos de corte em diferentes dias pós-infecção (dpi). Aos 3 dpi não foi possível observar efeitos dos

bioprodutos na redução das contagens de SH ($P>0,05$). No entanto, aos 7 (dpi) as contagens foram mais elevadas no conteúdo cecal de aves do grupo controle infectado ($P<0,05$) e mais baixas nos grupos tratados com bioprodutos (SANG e XPC). Aos 14 dpi, as aves do grupo que recebeu sanguinarina (SANG) foram as que apresentaram menores contagens ($P<0,05$).

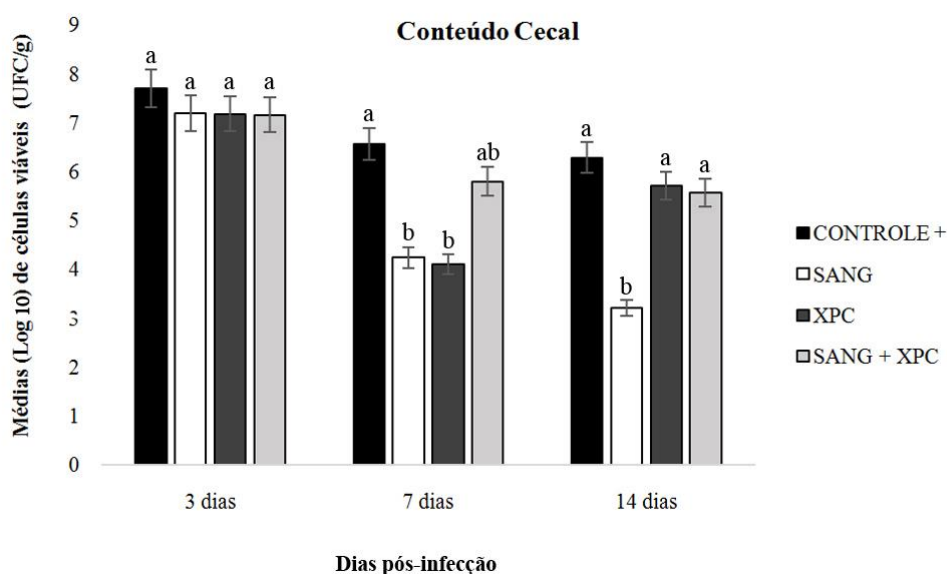


Figura 1. Média do número viável de unidades formadoras de colônias (Log 10 UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em conteúdo cecal de pintainhos de corte experimentalmente infectados no segundo dia de vida e submetidos a tratamentos com bioprodutos. Amostras de 3, 7 e 14 dias pós-infecção. Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P<0,05$).

1.5.2.2 Contagem de *Salmonella* Heidelberg em baço e fígado (infecção sistêmica)

As figuras 2 e 3 contêm dados referentes às contagens microbiológicas em baço e fígado, respectivamente, de pintinhos de corte em diferentes dias pós-infecção (dpi) com SH. As médias das contagens de SH nos dois órgãos se mantiveram baixas durante todo experimento. Não houve diferença estatística entre as contagens nas aves dos diferentes tratamentos ($P>0,05$).

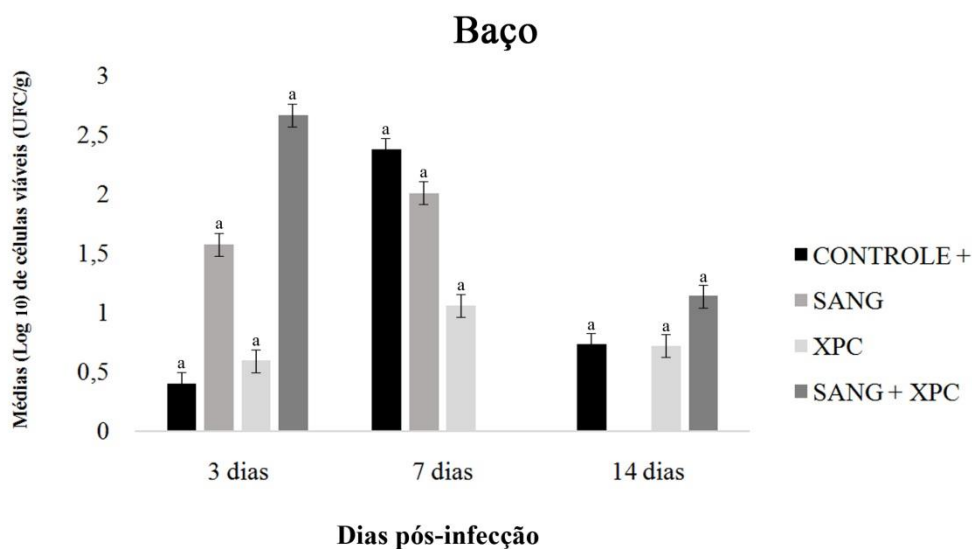


Figura 2. Média do número viável de unidades formadoras de colônias (Log10 UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em baço de pintainhos de corte experimentalmente infectados no segundo dia de vida e submetidos a tratamentos com bioprodutos. Amostras de 3, 7 e 14 (dpi). Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$).

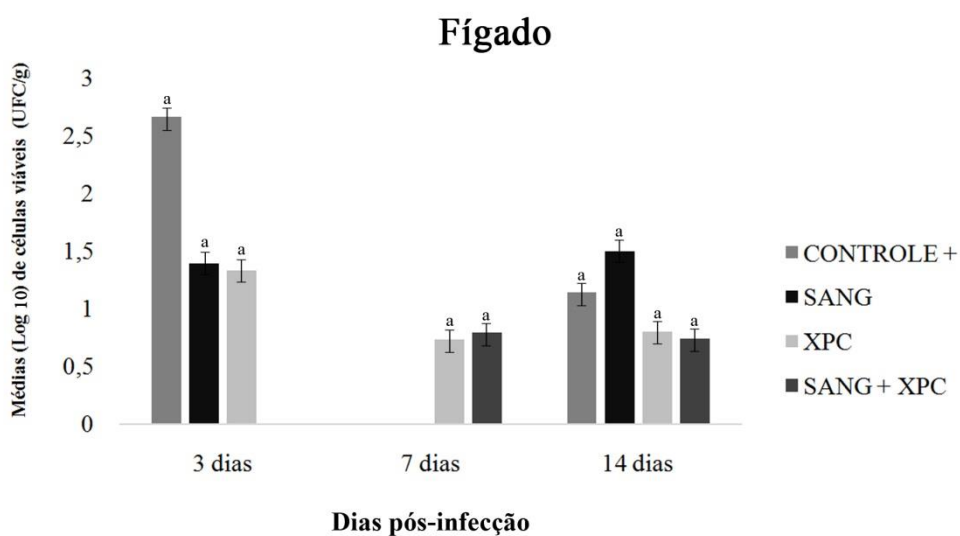


Figura 3. Média do número viável de unidades formadoras de colônias (Log10 UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em fígado de pintainhos de corte experimentalmente infectados no segundo dia de vida e submetidos a tratamentos com bioprodutos. Amostras de 3, 7 e 14 (dpi). Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$).

1.5.3 Alterações Macro e Microscópicas

As alterações macroscópicas foram semelhantes em aves dos grupos desafiados com SH ao longo do estudo. Inicialmente foram observadas áreas hemorrágicas na região do fígado, enterite discreta e hepatomegalia (aos 3 dpi). Posteriormente, espleno e hepatomegalia com congestão, enterite moderada e espessamento da mucosa intestinal (aos 7 dpi). Aos 14 dpi foi observado hepato e esplenomegalia, congestão, cápsula hepática irregular e espessamento da mucosa intestinal (Tabela S2). Descrições mais detalhadas das intensidades dos escores das alterações microscópicas observadas no ceco, fígado, e íleo coletados aos 3, 7 e 14 dpi estão disponíveis no material suplementar (Tabelas S3 a S6 e Figuras S1 a S3).

No ceco, foram observadas alterações microscópicas em aves de todos os grupos desafiados com SH. Os achados mais comuns foram infiltrados heterofílico e espessamento de lâmina própria. Notou-se que as aves suplementadas com sanguinariana (grupo SANG) apresentaram menor intensidade de infiltrado heterofílico e menos espessamento da lâmina própria que as aves dos outros grupos. As aves dos grupos suplementados com XPC e SANG + XPC apresentaram menos infiltrados heterofílicos e espessamento de lâmina própria que as do grupo C+.

Não foram observadas alterações macro e micro digno de nota em aves do grupo não desafiado (C-).

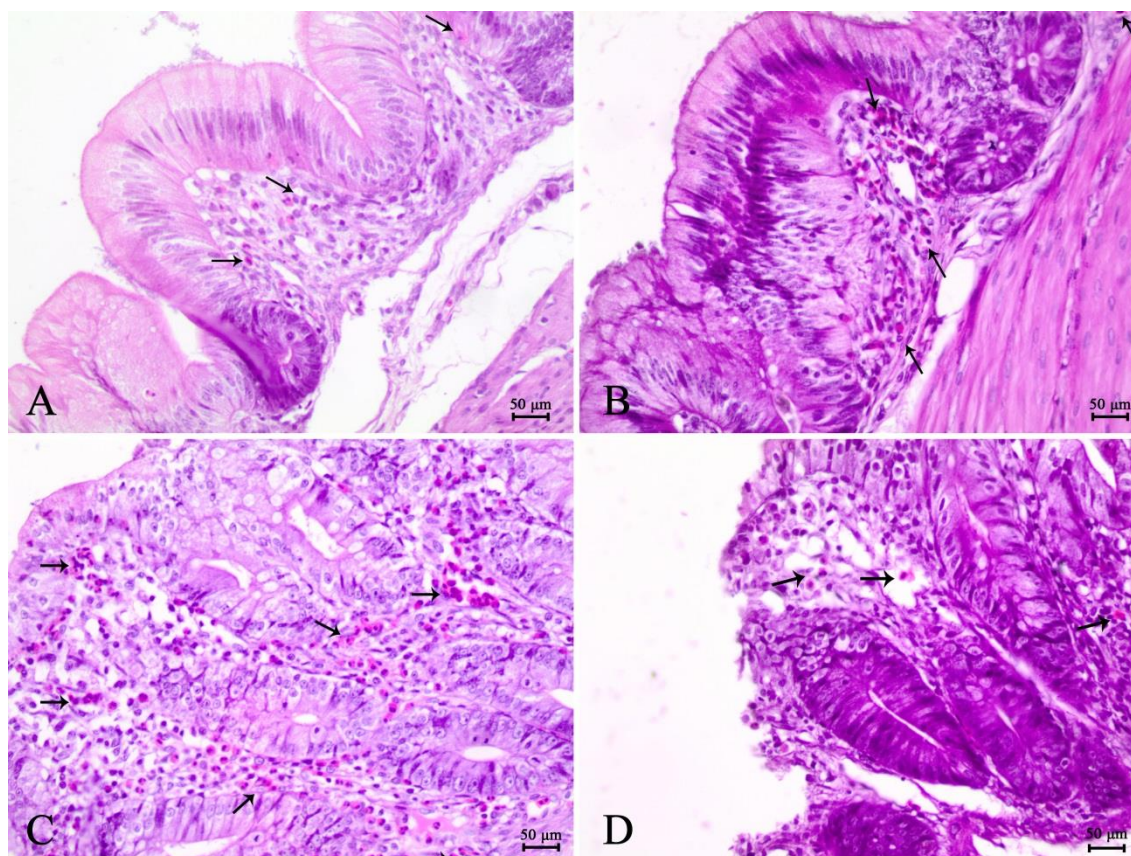


Figura 4. Fotomicrografia de infiltrados de heterófilos (setas) na lâmina própria do ceco de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg submetidos a diferentes tratamentos. (A) Grupo XPC aos 3 dpi. (B) Grupo SANG aos 7 dpi. (C) Grupo controle positivo aos 3 dpi. (D) SANG + XPC aos 7 dpi. HE, objetiva 40x.

No fígado as lesões microscópicas encontradas foram congestão de hepatócitos, infiltrado de heterófilos nos sinusóides, áreas de necrose com vacuolização de hepatócitos, agregados linfóides no parênquima hepático, heterófilos periportais e inflamação mononuclear (Figuras 5 e 6). Houve redução das alterações ao longo do experimento. Congestão acentuada nos hepatócitos foi observada apenas em aves do grupo controle infectado. Em aves dos outros grupos (SANG, XPC e SANG+XPC) foi vista congestão discreta dos hepatócitos. A intensidade de infiltrados de heterófilos foi discreta em aves do grupo SANG, enquanto que algumas aves dos outros grupos apresentaram infiltrados de heterófilos em intensidade moderada. As aves do grupo SANG foram as que apresentaram menor intensidade de áreas de necrose com vacuolização de hepatócitos. Agregados linfóides no parênquima hepático, heterófilos periportais e inflamação mononuclear em intensidade moderada foram observados principalmente em aves do grupo controle infectados. Nas aves que ingeriram os bioprodutos essas alterações foram mais discretas.

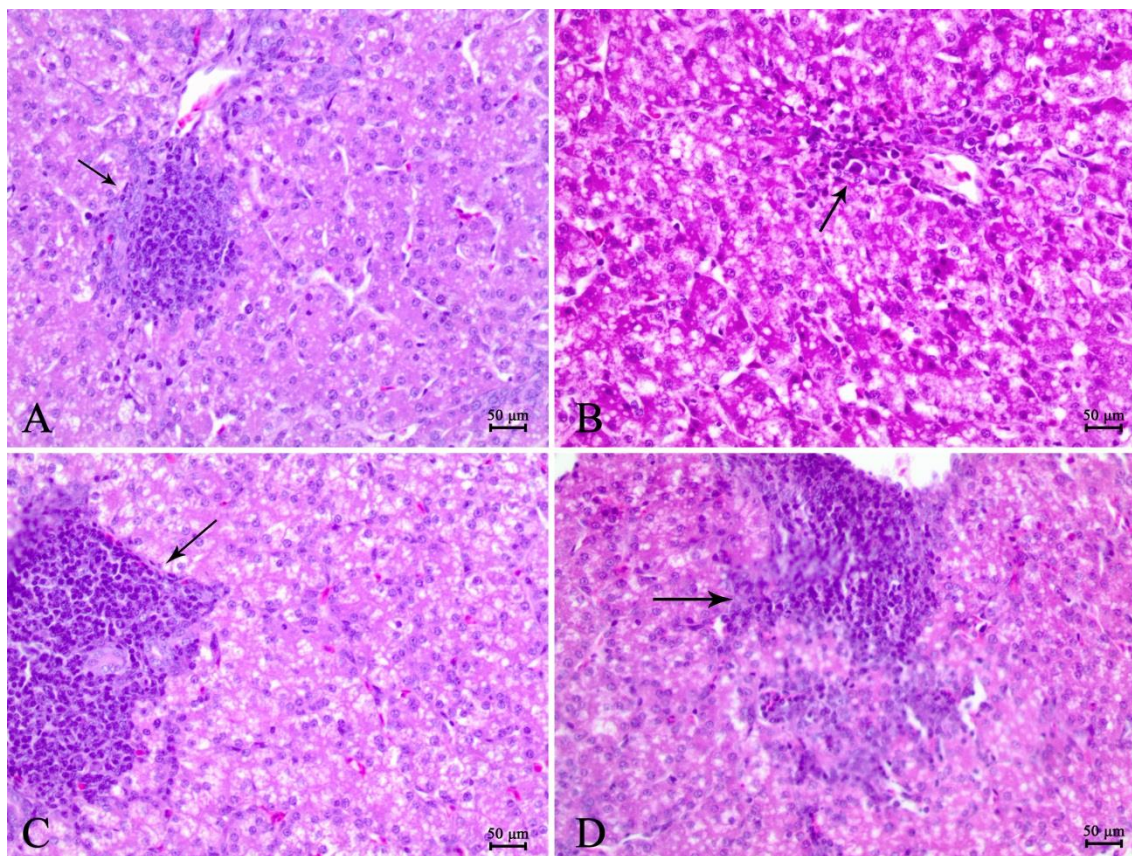


Figura 5. Fotomicrografia de fígados de pintainhos de corte aos 3 dias pós-infecção com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Infiltração mononuclear leve (seta) no grupo controle positivo. (B) Focos discretos de infiltrados heterófilos e necrose de hepatócitos (seta) no grupo SANG. (C) Inflamação mononuclear moderada (seta) no grupo XPC. (D) Infiltrado inflamatório leve (seta) no grupo SANG + XPC. HE, Objetiva 40x.

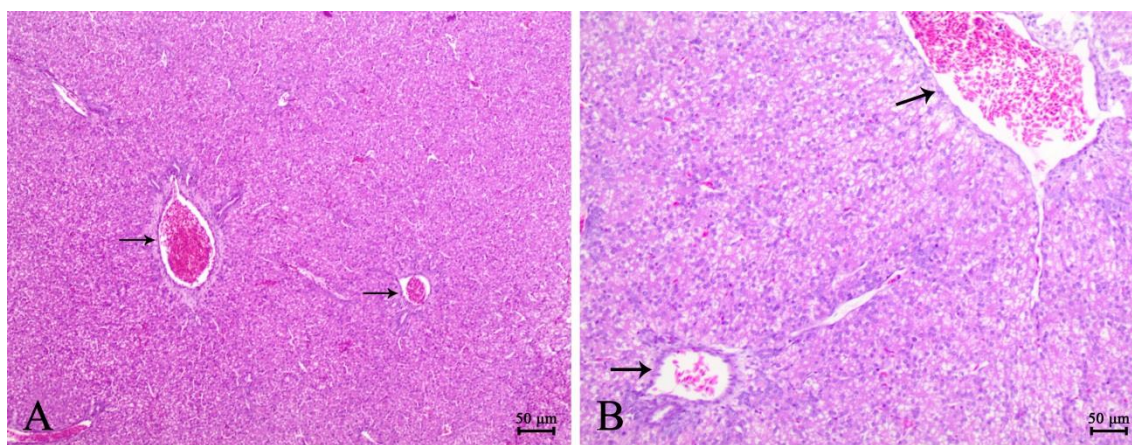


Figura 6. Fotomicrografia de fígado de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Congestão moderada em fígado (setas) aos 3 dpi, grupo SANG. HE, objetiva 10 x. (B) Congestão leve em sinusóides hepáticos (setas) no grupo XPC aos 7 dpi. HE, objetiva 20x.

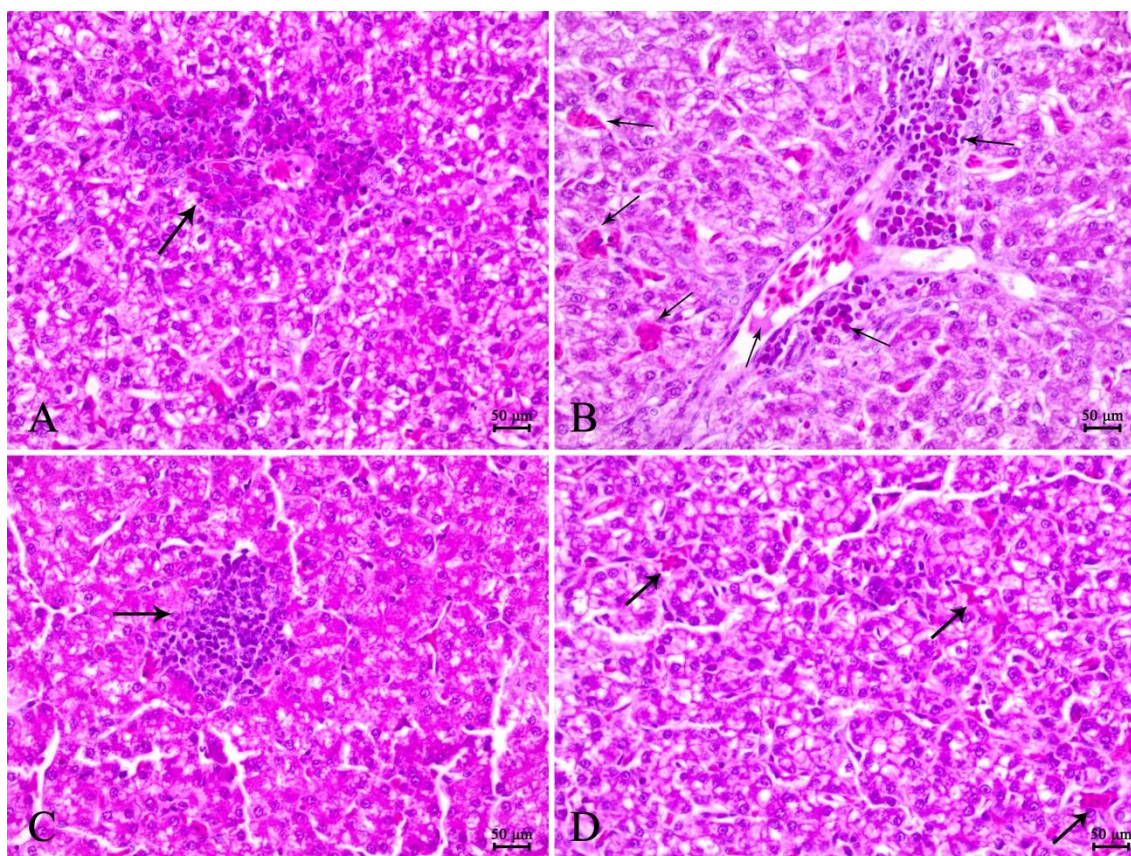


Figura 7. Fotomicrografia de fígado de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Área de necrose com foco inflamatório mononuclear difuso de hepatócitos (seta) no grupo SANG aos 7 dpi. (B) Infiltrado inflamatório composto por heterófilos perivasculares com macrófagos predominantes no espaço periportal (setas) no grupo controle aos 14 dpi. (C) Focos de infiltrado inflamatório leve composto por macrófagos (seta) no grupo SANG aos 7 dpi. (D) Infiltrados de heterófilos nos sinusóides hepáticos (seta) no grupo SANG +XPC aos 14 dpi. HE, objetiva 40x.

No íleo foram observadas congestão de lâmina própria (Figura 8), atrofia de vilosidades, atrofia de cripta, espessamento de lâmina própria e proliferação de enterócitos (Figura S4). Aves do grupo controle positivo e XPC apresentaram congestão de maior intensidade que as aves dos demais grupos desafiados. Por outro lado a atrofia de vilosidade foi mais severa em aves do controle positivo. Alteração do tipo atrofia de cripta foi observada de maneira semelhante em aves de todos os grupos infectados. Com relação ao espessamento de lâmina própria, as aves do grupo SANG foram as que apresentaram menos escores. Os enterócitos apresentaram-se com mais proliferação em aves do grupo controle positivo.

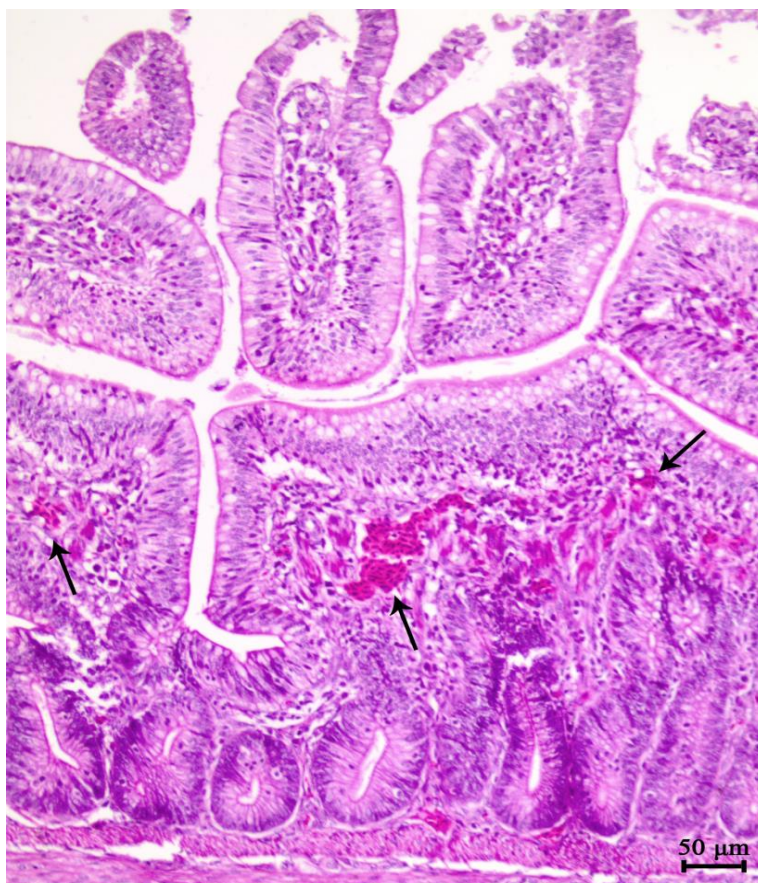


Figura 8. Fotomicrografia do íleo de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg. Nota-se congestão acentuada na lâmina própria (setas) em aves do grupo XPC aos 14 dpi. HE, objetiva 20x.

1.5.4 Histomorfometria do Íleo

As médias de parâmetros histomorfométricos do íleo de pintainhos desafiados com SH em diferentes intervalos estão disponíveis no material suplementar (Tabela S7). Aos 3 dpi, com relação à altura de vilosidades não houve diferença significativa entre grupos avaliados ($P>0,05$). Para profundidade de cripta, as médias mais elevadas foram observadas em aves do grupo (XPC) e menores médias em aves do grupo controle negativo ($P<0,05$). Não foram observadas nenhuma diferença significativa entre as variáveis relação vilo:cripta e área de vilosidade ($P>0,05$).

Aos 7 dpi, a altura de vilosidade foi maior em aves dos tratamentos controle negativo e com suplementação de SANG ($P<0,05$). Em relação à profundidade de cripta, a menor média foi observada em aves do grupo XPC e as maiores em pintainhos suplementados com SANG na dieta e controle positivo ($P>0,05$). Na relação vilo: cripta,

a menor média foi observada em aves do grupo controle positivo e a maior em aves do grupo XPC. A menor área de vilosidade a menor média foi observada em aves do grupo controle positivo e as mais elevadas em aves do grupo controle negativo e do SANG ($P<0,05$).

Aos 14 dpi, a altura de vilosidade foi mais elevada em aves dos grupos suplementados com SANG e SANG + XPC ($P<0,05$). Para a profundidade de cripta, a menor média foi obtida de aves do grupo controle sem SH e maior no grupo controle positivo ($P<0,05$). Na variável relação vilo:cripta, a maior média foi observada em pintainhos do grupo SANG +XPC e menor média em aves do grupo controle positivo ($P<0,05$). Para área de vilosidade, as médias mais elevadas foram obtidas de aves dos grupos SANG e controle negativo ($P<0,05$).

1.6 DISCUSSÃO

A *Salmonella* Heidelberg é atualmente um dos sorotipos predominantes nas criações de frango de corte do Brasil (PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2013). Segundo estudos prévios, a sanguinarina além de atuar na inibição da multiplicação bacteriana (HERRERA-MATA & ROSAS-ROMERO 2002), auxiliaria na modulação e estímulo da resposta imune (inata e adaptativa) da ave (PICKLER et al., 2013). O que poderia explicar a considerável redução de SH observada aos 14 dpi nas aves do presente estudo. Neste período, o sistema imune já não é completamente imaturo e pode ter sido estimulado pela sanguinarina a controlar a infecção intestinal por SH.

Crhanova et al. (2011) descreveram em aves a existência um eixo de resposta imune intestinal do tipo Th-17, a qual atuaria na destruição de patógenos intestinais, incluindo *Salmonella* Heidelberg. É possível que a sanguinarina tenha efeito modulatório desse tipo de resposta.

No presente trabalho, observou-se que nas aves suplementadas com XPC, a redução de SH ocorreu aos 7 dpi (10 dias de vida). Portanto, é possível que o produto também aja estimulando o sistema imune inato ou atue diretamente na inibição da multiplicação de *Salmonella* Heidelberg.

Não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) nas contagens de SH em amostras de fígado e baço colhidas de aves submetidas aos diferentes tratamentos. As contagens se mantiveram baixas ao longo do experimento, mesmo nas aves do grupo C+. Segundo

Gast et al. (2013), estirpes de sorotipos causadoras do paratifo aviário possuem patogenicidade variada, algumas são menos invasivas, permanecendo no trato digestório sem provocar infecção sistêmica severa.

Não foi possível avaliar a ação dos bioprodutos na redução da infecção sistêmica de SH por meio das contagens em baço e fígado. No entanto, notou-se alterações macroscópicas de grau moderado, incluindo aumento de volume e congestão de baço e fígado, em aves de todos os grupos infectados. Alterações compatíveis com quadro de infecção sistêmica transitória desencadeada por estirpes paratíficas de *Salmonella* spp. durante a infecção de aves (BARROW, 2000; BERCHIERI JUNIOR & FREITAS NETO, 2009).

Com relação aos exames microscópicos, os achados mais comuns no ceco foram infiltrados heterofílicos e espessamento de lâmina própria. Em fígado incluíram congestão de hepatócitos, infiltrado de heterófilos nos sinusóides, áreas de necrose e inflamação mononuclear. No íleo, as alterações mais encontradas foram congestão de lâmina própria, atrofia de vilosidades, atrofia de cripta e espessamento de lâmina própria. Notou-se que a intensidade de alterações microscópicas foi menor nas aves suplementadas com os bioprodutos, quando comparadas as do grupo controle infectado.

Aves suplementadas com sanguinarina (grupo SANG) foram as que menos desenvolveram alterações. A maioria das alterações nos tecidos, principalmente fígado e lâmina própria das alças intestinais são oriundas de processos inflamatórios (VAN IMMERSEEL et al., 2002), elaborados pelo organismo da ave na tentativa de debelar a infecção (LOPES et al., 2011). Tais reações nem sempre são vantajosas para as aves, resultando em danos teciduais e perdas metabólicas que pode afetar o desempenho das mesmas (COX et al., 2010). Ao que tudo indica ambos bioprodutos utilizados no presente estudo tiveram efeito imunomodulador, reduzindo os efeitos colaterais da resposta inflamatória desencadeada por SH. Lensing et al. (2012), estudando a ação do XPC também relatou redução da frequência e severidade das alterações no intestino de galinhas poedeiras comerciais.

Com relação aos parâmetros histomorfométricos do íleo, observou-se de maneira geral, ao longo do estudo, médias mais elevadas de altura e área de vilo em aves do grupo controle não infectadas e também nas do grupo SANG. As menores médias de altura de vilosidades foram encontradas nas aves do controle infectado, indicando ação deletéria da estirpe no epitélio intestinal (CHIQUEIRI et al., 2007; FURLAN et al., 2004; HANCOCK, 1990). Yamauchi & Ishiki (1991) destacam que o tamanho das vilosidades

está relacionado com o número de enterócitos e, conseqüentemente, maior a área de absorção dos nutrientes. Portanto, a ação da sanguinarina na redução da multiplicação de SH auxiliou também na recuperação ou manutenção da integridade da mucosa intestinal.

No parâmetro profundidade de cripta, o qual indica atividade de renovação epitélio intestinal (LOPES et al., 2011; PLUSKE et al.; 1997) as médias foram menores em aves do grupo controle negativo e as mais elevadas nas aves do grupo SANG. Segundo Furlan et al. (2004) aumento na profundidade de cripta indicam acelerada atividade proliferativa celular, que pode ocorrer não só devido a um efeito trófico de um ingrediente na dieta, mas também devido a alguma injúria da mucosa por processos inflamatórios. Possivelmente, a sanguinarina exerça também ação trófica no epitélio intestinal.

1.7 CONCLUSÃO

A adição de bioprodutos na dieta de aves, sobretudo da sanguinarina, auxiliou no controle da infecção por *Salmonella* Heidelberg, reduzindo sua contagem em conteúdo cecal e minimizando alterações em fígado, ceco e íleo. Portanto a adição de sanguinarina na dieta de aves por melhorar a saúde intestinal geral e intestinal das aves.

1.8 REFERÊNCIAS

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: Wray, C. (Ed.) **Salmonella in domestic animals**. Oxford: CAB International, p.323-339, 2000.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 435-453.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2014. U.S. Department of Health and Human Services,

CDC, Atlanta, GA, 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/national-surveillance/salmonella-surveillance.html>. Acesso em: 22 Dez. 2017.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNNOVA, M.; MATULOVA, M.; HAVLICKOVA H.; SISAK F.; RYCHLIK I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella* enterica serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2755-63, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01375-10>. Acesso em: 10 Mar. 2018.

CHIQUEIRI, J.; SOARES, R. T. R. N.; HURTADO NERY, V. L.; CARVALHO, E. C. Q.; COSTA, A. P. D. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n. 2, p.97-104, 2007.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A. M. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: Clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150–1153, 2006.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; DICKEL, E. L.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L.R. *Salmonella* Heidelberg isolated at different points of the broiler slaughter house. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 603-606, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572012000400018>. Acesso em: 17 Jan. 2018.

COX, C. M.; SUMNERS, L. H.; KIM, S.; McELOROY, A. P.; BEDFORD, M.R.; DALLOUL, R.A. Immune response to dietary β -glucan in broiler chicks during a *Eimeria* challenge. **Journal of Poultry Science**, Champaign v. 89, n.12, p. 2597-2607, 2010.

EVANS, M. C.; WEGENER, H. C. Antimicrobial Growth Promoters and *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. in Poultry and Swine, Denmark **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 489-92, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid0904.020325>. Acesso. 19 Fev. 2018.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. (2004). Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO. (2004), Balneário Camboriú, Santa Catarina: **Anais...** p. 6-28.

GAST, R. K.; GURAYA, R.; JONES, D. R.; ANDERSON, K. E. Colonization of internal organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. **Journal of Poultry Science**, v. 92, n. 2, p. 468–473, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps.2012-02811>>. Acesso em: 11 Fev. 2018.

HANCOCK, J. D.; PEO, E. R. J. R.; LEWIS, A. J.; MOXLEY, R. A. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. **Journal of Animal Science**, v.68, p. 3244-3251, 1990.

HARDIN, J. A.; CHUNG, B.; LOUGHLIN, E. V. O.; GALL, D. G. The effect of epidermal growth factor on brush border surface area and function in the distal remnant following resection in the rabbit. **Gut**. v. 44, n. 1, p. 26-32, 1999.

HERRERA-MATA, H.; ROSAS-ROMERO, A.; OSCAR, C. V. Biological activity of “Sanguinaria” (*Justicia secunda*) extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 3, p. 206-212, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1076/phbi.40.3.206.5826> >. Acesso em: 05 Fev. 2018.

IWAMOTO, M.; REYNOLDS, J.; KARP, B. E.; TATE, H.; FEDORKA-CRAY, P. J.; PLUMBLEE, J. R.; et al. Ceftriaxone-Resistant nontyphoidal *Salmonella* from humans, retail meats, and food animals in the United States, 1996-2013. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 2, p. 74–83, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2180> >. Acesso em: 09 Jan. 2018.

LENSING, M.; VAN DER KLIS, J. D.; YOON, I.; MOORE, D. T. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intestinal health and productivity of coccidian-challenged laying hens. **Journal of Poultry Science**, v. 91, n. 7, p. 1590–1597,

2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps.2011-01508>>. Acesso em: 02 Fev. 2018.

LOPES, C. C.; RABELLO, C. B.; SILVA JÚNIOR, V. A.; HOLANDA, M. C. R.; ARRUDA, E. M. F.; SILVA, J. C. R. Desempenho, digestibilidade, composição corporal e morfologia intestinal de pintos de corte recebendo dietas contendo levedura de cana-de-açúcar. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.33, n. 1, p.33- 40, 2011. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4025>>. Acesso em: 11 Fev. 2018.

MAHADY, G. B.; BEECHER, C. W. Quercetin-induced benzophenanthridine alkaloid production in suspension cell cultures of *Sanguinaria canadensis*. **Planta Medica** v. 60, n. 6, p. 553–557, 1994. Disponível em:<<https://doi.org/10.1055/s-2006-959570>>. Acesso em: 10 Jan. 2018.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/650733>>. Acesso em: 14 Jan. 2018.

PARK, S. H.; KIM, S. A.; LEE, S. I.; RUBINELLI, P. M.; ROTO, J. M.; PAVLIDIS, H. O.; MCINTYRE, D. R.; RICKE, S. C. Original XPCTM Effect on *Salmonella* Typhimurium and Cecal Microbiota from Three Different Ages of Broiler Chickens When Incubated in an Anaerobic In Vitro Culture System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1070, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01070>>. Acesso em: 23 Jan. 2018.

PICKLER, L.; BEIRAO, B. C. B.; HAYASHI, R. M.; DURAU, J. F.; LOURENCO, M. C.; CARON, L. F.; SANTIN, E. Effect of sanguinarine in drinking water on *Salmonella* control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 430-438, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/japr.2012-00649>>. Acesso em: 14 Fev. 2018.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production**

Science, v.51, p. 215-236, 1997. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/s0301-6226\(97\)00057-2](https://dx.doi.org/10.1016/s0301-6226(97)00057-2)>. Acesso em: 28 Jan. 2018.

PULIDO-LANDINEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V. P. Assignment of serotype to *Salmonella* enterica isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 288-294, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/lam.12110>>. Acesso em: 07 Jan. 2018.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais** - 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 252 p. 2011.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. 2. Ed. Editora Manole, 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the cecal lamina propria of chickens after neonatal infection with *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 355-364, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00084-2)>. Acesso em: 03 Fev. 2018.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. Á.; RODRIGUES, D. P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Journal of Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps/peu081>>. Acesso em: 24 Jan. 2018.

YAMAUCHI, K. E.; ISHIKI, Y. Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing White Leghorns and broiler chicken, from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**, v. 32, p. 67-78, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00071669108417328>>. Acesso em: 09 Fev.2018.

ZANCAN, F. B.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016>>. Acesso em: 18 Jan. 2018.

ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F.; FRIEDMAN, S., ABBOTT, J.; AYERS, S.; GLENN, A.; HALL-ROBINSON, E.; HUBERT, S. K.; HARBOTTLE, H.; WALKER, R. D.; CHILLER, T. M.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 106–117, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.106>>. Acesso em: 13 Fev. 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por melhores ferramentas de controle das salmoneloses é constante na avicultura industrial devido à problemas relacionados à comercialização de produtos contaminados com este patógeno. A salmonelose é considerada uma das enfermidades mais problemáticas para a saúde pública e na avicultura pela elevada endemicidade, alta morbidade e, acima de tudo, pela dificuldade no controle.

Dentre os sorotipos mais prevalentes, a *Salmonella* Heidelberg (SH) é um agente de infecção alimentar em humanos cujos casos de isolamento em aves e derivados têm aumentando consideravelmente no Brasil nos últimos anos, especialmente em lotes de frangos de corte e matrizes pesadas.

O controle deste patógeno apresenta-se bastante complexo, cepas diferentes respondem de forma ímpar. Diante deste cenário, o extrato de sanguinarina como ferramentas de controle foi capaz de reduzir a proliferação da *Salmonella* no ceco de pintainhos desafiados, além de proporcionar equilíbrio dos componentes da resposta imunológica celular do trato gastrointestinal e poucas alterações microscópicas, atuando como imunomodulador e recuperando a integridade da saúde intestinal nos pintainhos infectados com *Salmonella* Heidelberg.

As práticas de biossegurança e o controle sanitário são condições fundamentais para garantir à avicultura brasileira a conquista e manutenção de mercados internacionais com seus produtos de qualidade. Para futuras pesquisas sugere-se avaliação mais criteriosa com diferentes bioprodutos para compreensão da resposta microbiológica e imunológica em aves desafiadas com diferentes sorotipos de *Salmonella* ssp., o que poderá auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas para controle deste patógeno.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela S1- Média (\log^{10}) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de ceco de pintainhos de corte desafiados com SH em diferentes intervalos de tratamentos.

TRATAMENTOS	3 dpi	7 dpi	14 dpi
CONTROLE +	7,69 \pm 0,41 a	6,56 \pm 1,18 a	6,28 \pm 1,31 a
SANG	7,19 \pm 0,31 a	4,24 \pm 0,51 b	3,21 \pm 1,23 b
XPC	7,18 \pm 0,85 a	4,10 \pm 1,44 b	5,79 \pm 1,46 a
SANG +XPC	7,15 \pm 0,46 a	5,80 \pm 1,84 ab	5,56 \pm 1,38 a

Dpi: dias pós-infecção

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Tukey ($P < 0,05$).

Média \pm Erro-padrão da contagem bacteriana em ceco em cada momento.

Tabela S2- Alterações macroscópicas observadas em pintainhos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg após necropsia aos 3, 7 e 14 dpi em diferentes tratamentos.

GRUPOS	Dias pós-infecção		
	3	7	14
CONTROLE +	Hepatomegalia (3/5)	Enterite moderada (5/5) Esplenomegalia (2/5) Hepatomegalia com congestão (3/5)	Esplenomegalia com congestão (3/5) Hepatomegalia (3/5) Cápsula hepática irregular (2/5)
SANG	Enterite discreta (2/5)	Hepatomegalia (3/5)	Hepatomegalia com congestão (3/5)
XPC	Áreas hemorrágicas na região do fígado (2/5) Hepatomegalia (2/5)	Enterite moderada (2/5) Hepatomegalia (2/5)	Espessamento da mucosa intestinal (3/5) Fígado congesto (3/5)
SANG + XPC	-	Espessamento da mucosa intestinal (2/5)	Hepatomegalia (3/5)

Tabela S3- Alterações microscópicas observadas em ceco, fígado e íleo em diferentes períodos, em pintainhos de corte infectados com *Salmonella* Heidelberg no controle positivo.

CECO												
Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrados heterofílicos na lâmina própria	2	1	2		3	1	1		2	2	1	
Espessamento de lâmina própria	2	2	1		2	2	1		2	1	2	

FÍGADO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de hepatócitos	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1
Infiltrado de heterófilos nos sinusóides	2	2	1		3	2			2	2	1	
Áreas de necrose com vacuolização de hepatócitos	2	2	1		2	2	1		1	2	2	
Agregados linfóides em parênquima hepático	2	1	2		2	2	1		2	2	1	
Heterófilos periportais	2	2	1		2	2	1		3	2		
Inflamação mononuclear	3	2			2	2	1		2	2	1	

ÍLEO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de lâmina própria	2	2	1		3	2			2	1	1	1
Atrofia de criptas	2	2	1		2	2	1		2	3		
Espessamento de lâmina própria	2	1	2		2	2	1		3	1	1	
Proliferação de enterócitos	2	2	1		2	3			2	2	1	

Tabela S4 - Alterações microscópicas observadas em ceco, fígado e íleo em diferentes períodos, em pintainhos de corte infectados com *Salmonella* Heidelberg suplementados com SANG.

CECO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrados heterofílicos na lâmina própria	3	1	1		3	2			4	1		
Espessamento de lâmina própria	3	2			4	1			5			

FÍGADO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de hepatócitos	1	3	1		3	2			5			
Infiltrado de Heterófilos nos Sinusóides	2	3			3	2			4	1		
Áreas de necrose com vacuolização de hepatócitos	2	2	1		2	3			3	2		
Agregados linfóides em parênquima hepático	4	1			2	3			4	1		
Heterófilos periportais	3	2			3	2			3	2		
Inflamação mononuclear	3	1	1		3	2			4	1		

ÍLEO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de lâmina própria	2	2	1		3	2			4	1		
Atrofia de criptas	3	2			3	2			4	1		
Espessamento de lâmina própria	4	1			5				5			
Proliferação de enterócitos	3	2			4	1			4	1		

Tabela S5 - Alterações microscópicas observadas em ceco, fígado e íleo em diferentes períodos, em pintainhos de corte infectados com *Salmonella* Heidelberg suplementados com XPC.

CECO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrados heterofílicos na lâmina própria	2	2	1		3	2			3	2		
Espessamento de lâmina própria	4	1			2	3			4	1		

FÍGADO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de hepatócitos	2	2	1		3	2			3	2		
Infiltrado de heterófilos nos sinusóides	2	2	1		2	2	1		2	2	1	
Áreas de necrose com vacuolização de hepatócitos	3	1			2	3			2	3		
Agregados linfóides em parênquima hepático	3	2			3	2			4	1		
Heterófilos periportais	2	2	1		2	2	1		2	3		
Inflamação mononuclear	3	1	1		2	3			4	1		

ÍLEO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de lâmina própria	2	2	1		2	2	1		2	1	1	1
Atrofia de criptas	2	3			4	1			3	2		
Espessamento de lâmina própria	3	1	1		2	3			4	1		
Proliferação de enterócitos	3	2			2	3			2	3		

Tabela S6- Alterações microscópicas observadas em ceco, fígado e íleo em diferentes períodos, em pintainhos de corte infectados com *Salmonella* Heidelberg suplementados com SANG + XPC.

CECO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrados heterofílicos na lâmina própria	2	2	1		2	2	1		4	1		
Espessamento de lâmina própria	2	3			3	2			3	2		

FÍGADO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de hepatócitos	2	1	2		3	2			4	1		
Infiltrado de heterófilos nos sinusóides	2	2	1		2	2	1		3	2		
Áreas de necrose com vacuolização de hepatócitos	3	2			3	2			2	2	1	
Agregados linfóides em parênquima hepático	3	2			3	2			3	2		
Heterófilos periportais	3	2			2	2	1		3	2		
Inflamação mononuclear	2	3			2	3			4	1		

ÍLEO

Dpi	3				7				14			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Congestão de lâmina própria	2	2	1		3	2			4	1		
Atrofia de criptas	3	2			3	2			4	1		
Espessamento de lâmina própria	2	3			3	2			5			
Proliferação de enterócitos	4	1			3	2			4	1		

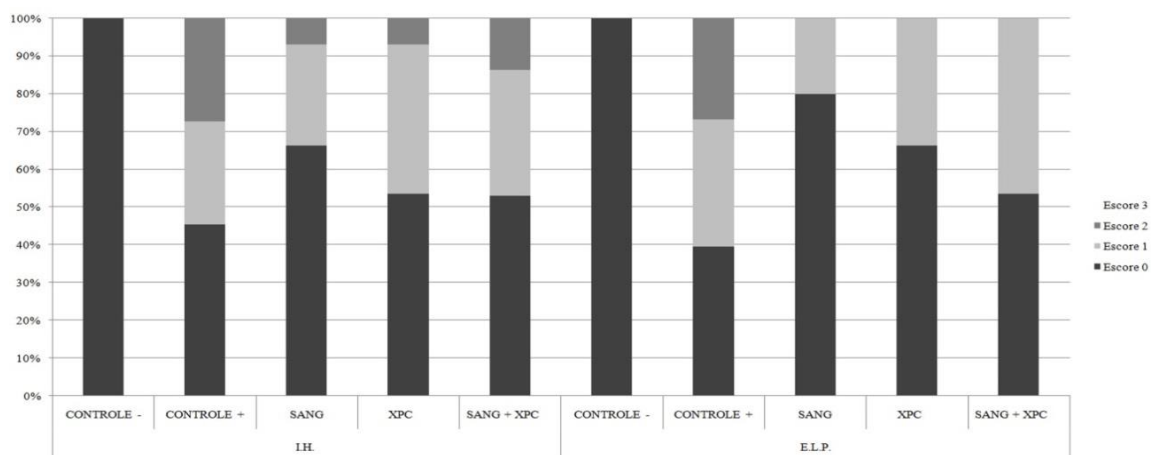


Figura S1. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em ceco de pintainhos de corte coletados nos dias 3, 7, e 14 dpi com a estirpe de *Salmonella* Heidelberg submetidos a diferentes tratamentos: CONTROLE NEGATIVO, CONTROLE POSITIVO, SANG, XPC e SANG + XPC. Escores de intensidade de lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações

moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: I.H. (Infiltrado Heterofílico); E.L.P. (Espessamento de Lâmina Própria).

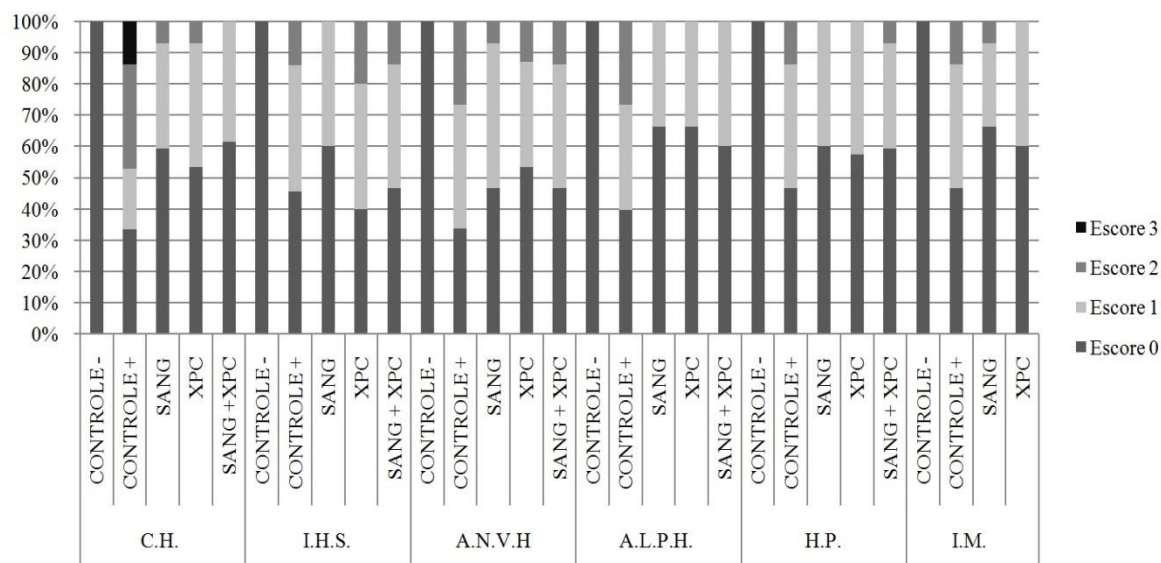


Figura S2. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em fígado de pintainhos de corte coletados nos dias 3, 7, e 14 dpi com a estirpe de *Salmonella* Heidelberg submetidos a diferentes tratamentos: CONTROLE NEGATIVO, CONTROLE POSITIVO, SANG, XPC e SANG + XPC. Escor de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: C.H. (Congestão de Hepatócitos); I.H.S. (Infiltrados de Heterófilos nos Sinusóides); A.N.V.H. (Área de necrose com vacuolização de hepatócitos); A.L.P.H. (Agregados Linfóides em Parênquima Hepático); H.P. (Heterófilos Periportais); I.M. (Inflamação Mononuclear).

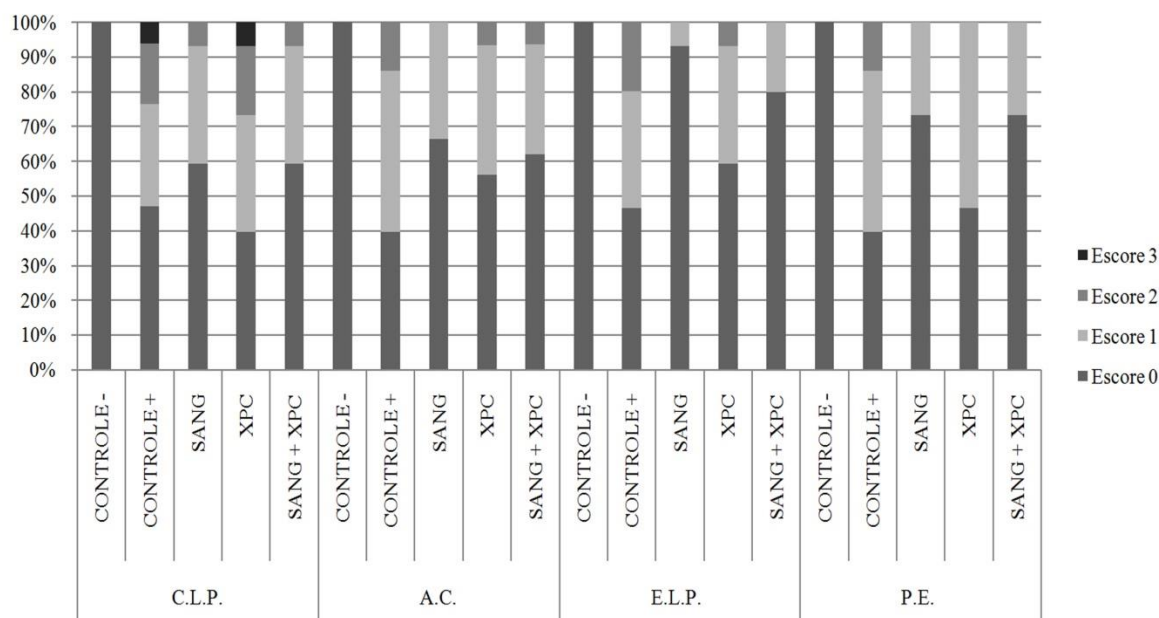


Figura S3. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em fígado de pintainhos de corte coletados nos dias 3, 7, e 14 dpi com a estirpe de *Salmonella* Heidelberg submetidos a diferentes tratamentos: CONTROLE NEGATIVO, CONTROLE POSITIVO, SANG, XPC, SANG + XPC. Escor de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: C.L.P. (Congestão de Lâmina Própria); A.C. (Atrofia de cripta); E.L.P. (Espessamento de Lâmina Própria); P.E. (Proliferação de Enterócitos).

Tabela S7- Média \pm Erro-padrão dos parâmetros histomorfométricos de íleo de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg aos 3, 7 e 14 dpi em diferentes tratamentos mensuradas em micrômetro (μm) da altura de vilo, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de vilosidade.

TRATAMENTOS	Altura de Vilosidade (μm)	Profundidade de Cripta (μm)	Relação Vilo/ cripta	Área de vilo (μm^2)
3 dpi				
CONTROLE -	93.27 \pm 15,50 a	25.99 \pm 5,366 b	3.70 \pm 0,826 a	3175,9 \pm 880,3 a
CONTROLE +	89.90 \pm 9,360 a	30.85 \pm 5,075 ab	3.05 \pm 0,519 a	3140.1 \pm 802,9 a
SANG	91.55 \pm 9,101 a	30.89 \pm 6,803 ab	3.07 \pm 0,666 a	3124.3 \pm 399,5 a
XPC	99.90 \pm 10,81 a	33.07 \pm 5,225 a	3.00 \pm 0,517 a	3475.2 \pm 102,6 a
SANG +XPC	91.02 \pm 10,77 a	28.49 \pm 6,255 ab	3.37 \pm 1,030 a	2853.2 \pm 798,1 a
7 dpi				
CONTROLE -	157.5 \pm 13,15 a	34.79 \pm 6,224 ab	4.34 \pm 0,895 ab	7321.9 \pm 214,8 a
CONTROLE +	131.2 \pm 8,375 b	41.50 \pm 5,166 a	3.20 \pm 0,451 b	5314.8 \pm 932,5 b
SANG	169.8 \pm 12,73 a	42.97 \pm 7,725 a	4.08 \pm 0,848 ab	7069.8 \pm 193,5 ab
XPC	136.1 \pm 11,01 b	30.10 \pm 7,400 b	4.82 \pm 1,360 a	6084.2 \pm 7,400 ab
SANG +XPC	134.9 \pm 11,50 b	37.25 \pm 7,358 ab	3.53 \pm 0,846 ab	5638.6 \pm 111,04 ab
14 dpi				
CONTROLE -	155.8 \pm 15,08 b	37.81 \pm 6,636 b	4.24 \pm 0,877 a	9422.1 \pm 2318,7 a
CONTROLE +	155.9 \pm 14,02 b	46.31 \pm 9,234 a	3.49 \pm 0,763 b	7250.7 \pm 2263,2 b
SANG	176.4 \pm 10,36 a	43.62 \pm 6,163 ab	4.11 \pm 0,606 a	8107.9 \pm 1659,7 ab
XPC	164.7 \pm 14,88 b	44.19 \pm 7,677 a	3.84 \pm 0,815 ab	6683.4 \pm 1785,4 b
SANG +XPC	176.9 \pm 15,59 a	43.11 \pm 8,829 ab	4.29 \pm 1,041 a	7243.2 \pm 11159,7 b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Tukey ($P < 0,05$).

ANEXO A – COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA A REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH (IJSR)

IJSR Initial Manuscript Submission

Submission Date	2018-05-11 23:25:16
Paper ID	ART20182429
Paper Title	EVALUATION OF SALMONELLA HEIDELBERG INFECTION IN BROILER CHICKS SUBMITTED TO TREATMENTS WITH A BIOPRODUCT
Total Authors	4
Desired Issue	Volume 7 Issue 5, May 2018
No. of Pages	12
E mail	oliveirocaetano@yahoo.com.br
Country	Brazil
Subject Area	Agriculture
You Are?	Post Graduate Student
Phone No:	5583996895503
Author Category	New Author
Author Name(s)	Raíssa Almeida Silva
How Did You Find Us?	Google
Editor Email	editor.ijsrnet@gmail.com
Date	11-05-2018